

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Vladimír Šteiger

**Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze
přirozených i náhodných hostitelů**

Molecular diagnostics of bird schistosomes during the infection of natural and
accidental hosts

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 4. 2018

.....

Vladimír Šteiger

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému školiteli Martinu Kašnému za odborné vedení této práce, cenné rady a obrovskou trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Petru Horákovi za jeho hodnotné a věcné připomínky k mé práci. Nesmím také zapomenout na Janu Bulantovou, které bych chtěl poděkovat za pomoc s veškerými odběry krve; a Tomáše Macháčka, kterému děkuji za poskytnutí vzorků a pomoc s vyhodnocováním výsledků. Samozřejmě bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře helmintologie za jejich rady, připomínky a psychickou podporu. Nakonec bych rád poděkoval rodině a všem kamarádům za podporu a trpělivost během mého studia.

Abstrakt

Ptačí schistosomy rodu *Trichobilharzia* patří mezi významné původce kožní hypersenzitivní reakce zvané cercáriová dermatitida. Tito parazité využívají jako mezihostitele plicnaté plže z čeledi Lymnaeidae, a jako definitivní hostitele především kachnovité ptáky. První larvální stádium, miracidium, ve vodě aktivně vyhledává a penetruje mezihostitelského plže, ve kterém se vyvíjí v mateřskou sporocystu. Vytvářejí se dceřiné sporocysty migrující do hepatopankreatu plže, kde dochází k asexuální produkci velkého množství cercárií. Ve vodním prostředí cercárie opouští mezihostitele, aktivně vyhledávají a penetrují do kůže definitivního hostitele. V jeho těle dospívají a produkují vajíčka. Cercárie však mohou penetrovat do kůže savců, včetně člověka, kde dochází k jejich rychlé eliminaci imunitním systémem za vzniku zánětlivé reakce. Dosud neexistuje spolehlivá metoda, která by u lidí byla schopná odlišit cercáriovou dermatitidu od jiných hypersenzitivních kožních reakcí a zároveň pomocí které by bylo možné spolehlivě diagnostikovat trichobilharziózu u kachen.

Hlavním cílem této práce bylo, za použití molekulárních metod diagnostikovat nákazu ptačími motolicemi u experimentálně nakažených přirozených (kachen) i náhodných hostitelů (myší, lidí). Za účelem optimalizace experimentů byla pomocí konvenční PCR vyšetřována hemolymfa mezihostitelských plžů *Radix lagotis* a *Lymnaea stagnalis* na přítomnost 396 bp tandemově repetitivní sekvence DNA *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*. Dále byly pomocí qPCR testovány vzorky krevního séra experimentálně infikovaných kachen, myší a náhodně nakažených lidí. Úspěšně se podařilo detekovat parazitární DNA ve všech vzorcích hemolymfy infikovaných plžů, u vzorků krevních sér byl zaznamenán pouze částečný úspěch.

Klíčová slova: Molekulární diagnostika, *Trichobilharzia*, cell-free DNA

Abstract

Bird schistosomes of the genus *Trichobilharzia* are known as causative agents of hyper-immune skin reaction called cercarial dermatitis (swimmer's itch). They use pulmonary water snails from family Lymnaeidae as the intermediate host and mostly anatid birds as the definitive host. The first larva, miracidium, actively moves in water environment, penetrates the snail and develops to the mother sporocyst. Then the daughter sporocysts are formed and migrate to the hepatopancreas of the snail where the high number of cercariae is asexually produced. Cercariae leave the intermediate host, actively move in a water and penetrate the skin of definitive host. Within a host body they mature and lay eggs. Cercariae can penetrate also the mammalian skin, including human, where they are immediately eliminated by the immune system of the host, which is followed by inflammatory reaction. Until now, for humans, there is no effective method enabling to differ cercarial dermatitis from other hyper-immune skin reactions and for birds the reliable diagnostic method of trichobilharziasis is missing.

The main aim of this thesis was to use the molecular methods for diagnostic of bird schistosomes infection in natural (ducks) and accidental hosts (mice, human). For optimization, the conventional PCR was used for detection of 396 bp tandem repeated DNA sequence of *Trichobilharzia regenti* and *T. szidati* in the hemolymph of intermediate hosts *Radix lagotis* and *Lymnaea stagnalis*. Subsequently, the qPCR was applied for the detection of parasite DNA in sera samples of experimentally infected ducks, mice and accidentally infected humans. The detection of parasite DNA in the hemolymph of infected snail was successful, but in the case of sera samples only partial success was achieved.

Keywords: Molecular diagnostics, *Trichobilharzia*, cell-free DNA

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Čeleď Schistosomatidae.....	3
3.1.1	Rod Trichobilharzia	3
3.2	Diagnostické metody v parazitologii.....	6
3.2.1	Molekulární metody	8
3.2.2	Cell-free DNA.....	23
4	Metodika	29
4.1	Modelové organismy.....	29
4.1.1	Ptačí motolice.....	29
4.1.2	Náhodní hostitelé	29
4.2	Získávání cercárií pro experimentální nákazy	29
4.3	Experimentální nákazy.....	30
4.3.1	Experimentální nákazy kachen.....	30
4.3.2	Experimentální nákazy myší	30
4.4	Získání biologického materiálu a jeho zpracování.....	30
4.4.1	Vzorky krve.....	30
4.4.2	Vzorky krevního séra infikovaných lidí.....	31
4.4.3	Vzorky nervové tkáně	31
4.4.4	Vzorky hemolymfy	31
4.4.5	Separace krevního séra.....	32
4.5	Molekulární analýza.....	33
4.5.1	Izolace DNA.....	33
4.5.2	PCR	34
4.5.3	Gelová elektroforéza	38
4.5.4	Příprava vzorků na sekvenaci.....	39

4.5.5	Analýza výsledků sekvenace.....	39
4.5.6	Real-time PCR	39
4.5.7	Analýza výsledků Real-time PCR.....	40
5	Výsledky	41
5.1	Testování detekčního limitu primerů	41
5.2	Detekce parazitární DNA v hemolymfě plžů.....	43
5.2.1	Detekce DNA <i>T. regenti</i> v hemolymfě <i>R. lagotis</i>	43
5.2.2	Detekce DNA <i>T. szidati</i> v hemolymfě <i>L. stagnalis</i>	46
5.3	Determinace mezihostitelského plže	47
5.4	Real-time PCR	48
5.4.1	Detekce parazitární DNA v krevním séru přirozených hostitelů	50
5.4.2	Detekce parazitární DNA v krevním séru náhodných hostitelů – myši	53
5.4.3	Detekce parazitární DNA v krevním séru náhodných hostitelů – lidí.....	56
5.4.4	Detekce parazitární DNA ve vzorcích nervové tkáně myši	58
6	Diskuze.....	61
6.1	Výběr molekulárních markerů	61
6.2	Detekce parazitární DNA v hemolymfě mezihostitelských plžů	62
6.3	Optimalizace pro Real-time PCR.....	65
6.4	Detekce parazitární cfDNA v krevním séru přirozených obratlovčích hostitelů	66
6.5	Detekce parazitární cfDNA v krevním séru náhodných obratlovčích hostitelů.....	67
6.6	Detekce parazitární cfDNA v krevním séru nakažených lidí.....	68
6.7	Detekce parazitární DNA v nervové tkáni experimentálně nakažených myši	70
7	Závěr	71
8	Seznam použité literatury.....	73

Seznam použitých zkratk

A/T	adenosin/thymin
ag	Attogram
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pair (páry bází)
cfDNA	Cell-free DNA (volná deoxyribonukleová kyselina)
CNS	Centrální nervová soustava
cox	Cytochrom oxidáza
Cq	Quantification cycle (kvantifikační cyklus)
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dpi	Dni po infekci
dsDNA	Double-stranded DNA (dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPG	Eggs per gram (počet vajíček na gram stolice)
fg	Femtogram
G/C	Guanin/cytosin
HRM	High resolution melting
Ig	Imunoglobulin
IL-4	Interleukin 4
ITS	Internal transcribed spacer
kbp	Kilo base pair (tisíce párů bází)
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
nad	Nikotinamidadenindinukleotid dehydrogenáza
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NCBI	National center for biotechnology information
ng	Nanogram
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pg	Pikogram
qPCR	Quantitative PCR (kvantitativní polymerázová řetězová reakce)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
rDNA	Ribozomální deoxyribonukleová kyselina
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
T _m	Teplota tání

1 Úvod

Ptačí schistosomy jsou kosmopolitně rozšířenou skupinou motolic, běžně se vyskytující i na území České republiky. Jejich životní cyklus je vázán na stojaté vody s výskytem vhodných meziphostitelských plžů a ptáků, jako definitivních hostitelů (Horák *et al.*, 1998a; Rudolfová *et al.*, 2006; Jouet *et al.*, 2008; Brant *et al.*, 2011; Ebbs *et al.*, 2016). Larvální stádia, cercárie, však mohou penetrovat i do kůže náhodných savčích hostitelů a způsobovat tak kožní hypersenzitivní reakci zvanou cercáriová dermatitida (swimmer's itch). Z tohoto důvodu tvoří ptačí schistosomy z medicínského a veterinárního hlediska významnou skupinu (Cort, 1928; Horák and Kolářová, 2001; Kouřilová *et al.*, 2004b; Kolářová *et al.*, 2013). V Evropě jsou nejčastějšími původci cercáriové dermatitidy zástupci rodu *Trichobilharzia* (Hertel *et al.*, 2002; Kolářová *et al.*, 2013).

Ačkoliv je většina cercárií v kůži náhodného hostitele eliminována imunitním systémem, některé se dokáží transformovat na larvální stádium schistosomula a následně migrovat tělem hostitele do různých vnitřních orgánů. Schistosomula viscerálního druhu *Trichobilharzia szidati* nalézáme především v cévách nebo tělní stěně tenkého střeva kachnovitých ptáků, ale v některých případech byla objevena také v plicích a dalších orgánech náhodných hostitelů (např. myši) (Haas and Pietsch, 1991; Horák and Kolářová, 2000). Dospělci dalšího druhu *Trichobilharzia regenti* jsou na rozdíl od *T. szidati* lokalizováni především v nosní dutině kachnovitých ptáků, přičemž za zmínku stojí i nálezy schistosomul v míše experimentálně infikovaných myši (Horák *et al.*, 1999; Hrádková and Horák, 2002). Bylo prokázáno, že nákazy neurotropním druhem *T. regenti* mohou u hostitelů vyvolávat neuromotorické poruchy (Horák *et al.*, 1999). Z tohoto důvodu by mohlo být výhodné odlišit cercáriovou dermatitidu od ostatních kožně senzitivních reakcí a determinovat jejího původce.

V dnešní době je často využívaným molekulárním markerem v onkologii či prenatalní diagnostice volná DNA (cell-free DNA, cfDNA) (Goessl, 2003; Fiegl *et al.*, 2005; Dennis Lo and Chiu, 2007; Gormally *et al.*, 2007; Lo and Chiu, 2008). K uvolnění cfDNA do krevního oběhu a dalších tělních tekutin dochází nejčastěji v souvislosti s nekrotizací a apoptózou buněk (Anker *et al.*, 1999; Stroun *et al.*, 2001; Fleischhacker and Schmidt, 2007; Gormally *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010). V parazitologii bylo dosud publikováno několik desítek studií zaměřených především na detekci cfDNA lidských schistosom v různých tělních tekutinách hostitele (Wichmann *et al.*, 2009; Cnops *et al.*, 2013; Weerakoon and McManus, 2016; Weerakoon *et al.*, 2016). Z těchto studií vychází i tato práce, která se zabývá návrhem a optimalizací molekulárně-diagnostických metod pro detekci DNA ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* u přirozených a náhodných hostitelů.

2 Cíle práce

- **Hlavní cíl:** V navržené práci by měla být za pomoci molekulárních metod diagnostikována nákaza motolicemi rodu *Trichobilharzia* u bezobratlých a obratlovčích hostitelů.
- **Dílčí cíle této práce jsou:**
 1. Experimentálně ověřit možnosti zachytu parazitární DNA ve vzorcích hemolymfy plžů.
 2. Experimentálně ověřit možnosti zachytu parazitární DNA ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných kachen a myší.

3 Literární přehled

3.1 Čeled' Schistosomatidae

Čeled' Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) je kosmopolitně rozšířená skupina parazitických organismů zahrnující okolo 100 druhů ve 14 rodech (Lockyer *et al.*, 2003). Všichni zástupci mají dvouhostitelské životní cykly, využívají vodní plže jako mezihostitele a ptáky nebo savce jako definitivní hostitele. Jejich životní cykly jsou vázané na vodní prostředí, kde také dochází k nákaze po aktivní penetraci larválního stádia parazita do kůže definitivního hostitele (Loker and Brant, 2006). Dospělci parazitují v oběhovém systému, souvisí s tím také přítomnost dvojité povrchové membrány tegumentu, která má nejspíš důležitou ochrannou funkci v tomto imunitně agresivním prostředí (McLaren and Hockley, 1977; Abath and Werkhauser, 1996). Zvláštním znakem této čeledi je přítomnost gonochorismu a často výrazného sexuálního dimorfismu, což je u motolic poměrně vzácný jev (Despres and Maurice, 1995).

Čeled' Schistosomatidae je medicínsky i veterinárně významnou skupinou parazitů, která může způsobovat cercáriovou dermatitidu (převážně ptačí schistosomy) nebo mnohem závažnější schistosomózu (lidské schistosomy), druhé jmenované onemocnění může končit i smrtí hostitele. Na světě je schistosomózou ohroženo více než 206 milionů lidí, především v tropických a subtropických oblastech a řadí se tak mezi tzv. „Neglected tropical diseases“. Původci lidské schistosomózy jsou *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mekongi* a *S. guineensis* (WHO, 2018).

3.1.1 Rod *Trichobilharzia*

Rod *Trichobilharzia* (čeled': Schistosomatidae) je největším rodem z čeledi Schistosomatidae a zahrnuje přibližně 40 druhů (Blair and Islam, 1983). Tento rod spadá mezi ptačí schistosomy a jeho zástupci mají dvouhostitelské životní cykly, kde využívají plicnaté plže jako mezihostitele a ptáky jako definitivní hostitele. Životní cyklus začíná líhnutím obrvené larvy (miracidia) z vajíčka, převážně po jeho uvolnění do vnějšího prostředí, avšak například u nazálního druhu *Trichobilharzia regenti* dochází k líhnutí miracidii po kontaktu s vodou (např. při pití nebo krmení ptáků) už v nosní dutině (Horák *et al.*, 1998a). Miracidia poté aktivně vyhledávají své mezihostitele – plicnaté plže, kde je pozorována vysoká hostitelská specifita pro jednotlivé druhy. Miracidium aktivně penetruje do svalnaté nohy plže, současně odvrhuje ciliární destičky, tvoří si povrchový tegument a dochází k jeho transformaci v mateřskou sporocystu (Horák *et al.*, 2002).

Další fáze vývoje zahrnují asexuální množení, kdy mateřská sporocysta produkuje sporocysty dceřiné, které migrují do hepatopankreatu plže, ve kterém jsou následně produkována obrovská množství cercárií. Cercárie opouštějí tělo plže, poté aktivně vyhledávají a penetrují do definitivního hostitele (Horák *et al.*, 2002). Během penetrace dochází k odvržení ocásku,

k vyprázdnění sekrečních (penetračních) žláz a ke změně povrchu cercárií (odvržení glykokalyx a vytvoření dvojité povrchové membrány), čímž je charakterizováno stádium schistosomula (Horák *et al.*, 1998b; Chanová *et al.*, 2009). Nezbytnou součástí exkrečně/sekrečních produktů jsou proteolytické enzymy, které napomáhají samotné penetraci cercárie a následné migraci schistosomula v těle hostitele (Bahgat *et al.*, 2001; Mikeš *et al.*, 2005). Ke kopulaci a produkci vajíček dochází až v místě finální lokalizace, podle které se rod *Trichobilharzia* rozděluje na viscerální (např. *Trichobilharzia szidati*, *Trichobilharzia franki*) a nazální (např. *Trichobilharzia regenti*, *Trichobilharzia australis*) druhy (Blair and Islam, 1983; Horák *et al.*, 2002). U viscerálních zástupců jsou vajíčka obvykle produkována v kapilárách vnitřních orgánů, kde se poté vlivem zánětlivých reakcí hostitele dostávají skrze tkáň do lumen střeva a následně s výkaly do vnějšího prostředí (Horák *et al.*, 2002). U nazálních druhů jsou vajíčka kladena do tkání nosní sliznice a miracidia se líhnou přímo v nosní dutině hostitele po kontaktu s vodou (Horák *et al.*, 1998a). Obecný životní cyklus *Trichobilharzia* spp. je znázorněn v **Obr. 1**.

Cercárie také příležitostně mohou penetrovat do kůže savčích hostitelů včetně člověka, kde se sice transformují na schistosomula a zároveň dochází i k jejich migraci tkáněmi, avšak nedochází k vývoji v dospělce ani produkci vajíček a parazit je dříve či později imunitním systémem eliminován. Právě vlivem imunitních reakcí dochází v místech penetrace ke vzniku kožní alergické reakce, tzv. cercárievé dermatitidy (Horák and Kolářová, 2001; Kouřilová *et al.*, 2004b; Kolářová *et al.*, 2013).

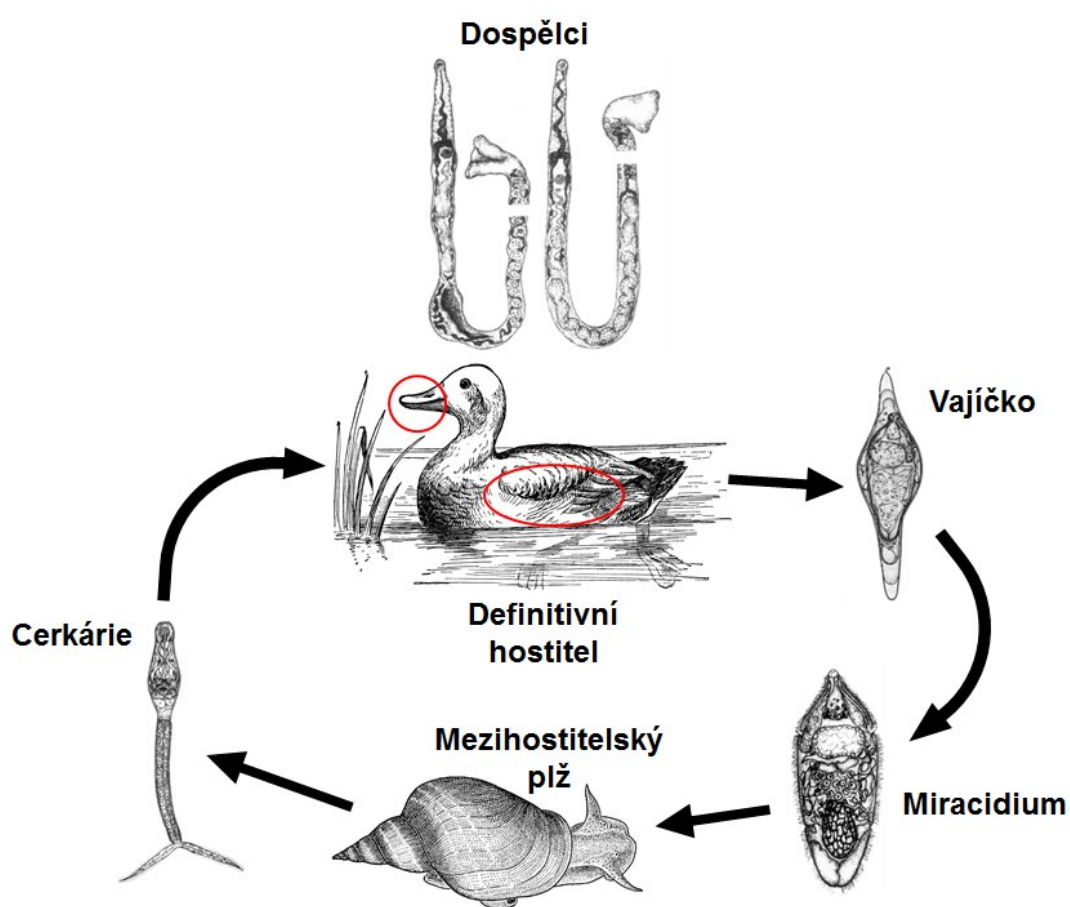
• ***Trichobilharzia regenti***

Životní cyklus motolice *Trichobilharzia regenti* (Horák, Kolářová, Dvořák, 1998) zahrnuje plže rodu *Radix* (čeleď: Lymnaeidae) jako mezihostitele a kachnovité ptáky (čeleď: Anatidae) jako definitivní hostitele. Z důvodu finální lokalizace dospělců ve tkáních nosní dutiny patří *T. regenti* do skupiny nazálních druhů (Horák *et al.*, 1998a; Jouet *et al.*, 2010a). Cercárie jsou po penetraci transformovány na schistosomula, která v těle svých hostitelů vykazují, na rozdíl od ostatních zástupců rodu, neurotropní chování; do 36 h po infekci opouštějí kůži a vstupují do periferních nervů, kterými následně migrují do míchy. Afinita k nervové tkáni je pozorovatelná jak u definitivních, tak i u náhodných hostitelů, schistosomula byla nalezena např. i v míše experimentálně infikovaných myší (Horák *et al.*, 1999; Hrádková and Horák, 2002). Důsledkem této neurotropní migrace se u hostitelů relativně často vyskytují neuromotorické poruchy např. paralýzy končetin (Horák *et al.*, 1999).

Penetraci a následnou migraci umožňuje u *T. regenti* pravděpodobně především peptidáza cathepsin B2 (TrCB2), která dokáže štěpit keratin, kolagen, elastin a „myelin basic protein“ (Dolečková *et al.*, 2009). V míše jsou schistosomula detekovatelná od 3 dpi u kachen a už 2 dpi u myší. Míchou probíhá migrace parazita několik dní, mozek začínají invadovat od 10 dpi. U myší se v mozku nacházejí schistosomula zcela výjimečně. Od 13 dpi je možné pozorovat dospělé

v místě finální lokalizace – nosní sliznici, kde dochází ke kopulaci a od 15 dpi následně i k produkci vajíček (Horák *et al.*, 1999; Hrádková and Horák, 2002; Chanová and Horák, 2007). Vajíčka jsou však produkována pouze u ptačích (definitivních) hostitelů, nacházejí se ve tkáních nazální sliznice a k líhnutí miracidíí dochází při kontaktu s vodou přímo v nosní dutině (Horák *et al.*, 1998a).

Obr. 1. Obecný životní cyklus *Trichobilharzia* spp. s vyznačenými místy finální lokalizace (dle Horák *et al.*, 1998a). Nosní dutina: např. *T. regenti*, *T. australis*; vnitřní orgány: např. *T. szidati*, *T. franki*.



- ***Trichobilharzia szidati***

Trichobilharzia szidati (Neuhaus, 1952) patří do skupiny viscerálních druhů s konečnou lokalizací dospělců v cévách tenkého střeva nebo přímo v jeho stěně (Neuhaus, 1952; Bourns *et al.*, 1973). V životním cyklu *T. szidati* působí obvykle jako mezipřehoditelé plži druhu *Lymnaea stagnalis* a definitivními hostiteli jsou kachnovití ptáci (čeleď: Anatidae) (Neuhaus, 1952; Kock, 2001).

Po penetraci kůže obratlovčího hostitele cercáriemi dochází k jejich transformaci v schistosomula, která vyhledávají cévy a krevním řečištěm jsou zanášena do plic. Schistosomula opouští kůži do 4 dpi (Haas and Pietsch, 1991). V plicích probíhá výživa a růst parazita, v této fázi infekce jsou schistosomula detekovatelná až 16 dpi u kachen a 10 dpi u myši, obvykle však do 10 dpi a 6 dpi (Bourns *et al.*, 1973; Horák and Kolářová, 2000; Chanová *et al.*, 2007). Při plicní fázi infekce však dochází k eliminování většiny schistosomul imunitním systémem, a to i u kompetentních hostitelů (Horák *et al.*, 2002). U savčích hostitelů může také docházet k invazi dalších vnitřních orgánů, všechna schistosomula však v těle hostitele hynou, u myši je tomu obvykle do 6 dpi (Appleton and Brock, 1986; Haas and Pietsch, 1991). Opuštění plic opět probíhá přes krevní řečiště, kde se krví dostávají do portální žíly a zde dospívají. Nakonec dospělci migrují do místa finální lokalizace, ve kterém probíhá kopulace a následná produkce vajíček, která se dostávají do vnějšího prostředí se stolicí. U definitivních hostitelů dochází k vymizení dospělců do 21 dpi (Bourns *et al.*, 1973; Horák *et al.*, 2002).

Důležitým faktem je, že *T. szidati* a *T. ocellata* je podle molekulárních analýz jeden a ten samý druh a měl by se pro něj používat jednotný název *T. szidati* (Rudolfová *et al.*, 2005). V této práci je proto jednotně používán název *T. szidati*.

3.2 Diagnostické metody v parazitologii

Diagnostické metody v parazitologii jsou založené na přímém (přítomnost samotných parazitů včetně vajíček, přítomnost DNA nebo přítomnost jejich specifického antigenu) a na nepřímém (imunitní odpověď hostitele na přítomnost parazita – protilátky) důkazu výskytu parazita v nejrůznějších vzorcích odebraných hostiteli (např. tkáňová biopsie, sputum, moč, mozkomíšní mok, krev, stolice) (Garcia, 2009). Tyto metody se dají rozdělit do několika základních skupin, kde každé mají své výhody a nevýhody, na tomto základě je tedy při diagnostice parazitóz důležité zvolit optimální metodu (Traversa *et al.*, 2008; Garcia, 2009). Hlavní rozdíly mezi jednotlivými metodami jsou shrnuty v **Tab. 1**. Jelikož se tato práce zabývá molekulárními metodami, ostatní typy metod jsou popsány pouze okrajově.

U **mikroskopických metod** je hlavním cílem prokázat přítomnost parazita (vajíčko, proglotida tasemnic, larva, dospělec) a dále za použití morfologických znaků určit, o jaký druh se jedná (Garcia, 2009), proto je zapotřebí zkušeného pozorovatele pro provedení správné determinace parazita a k zamezení falešně pozitivních či falešně negativních výsledků (Pontes *et al.*, 2003; Gordon *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2011). V některých případech však není možná morfologická determinace, např. vajíčka některých druhů tasemnic jsou morfologicky víceméně totožná (Gordon *et al.*, 2011).

V diagnostice helmintóz je nejčastěji používanou metodou koprologické vyšetření, tedy hledání přítomnosti parazita (především vajíček) ve vzorku stolice. Pro zvýšení senzitivity se využívá koncentračních metod (sedimentace, flotace), které jsou založeny na rozdílné hustotě vajíček a přidaného roztoku (Georgi, 1969). Běžně používanými metodami jsou např. FLOTAC, McMaster nebo Kato-Katz, které umožňují kvantitativně determinovat nákazu na základě počtu parazitických útvarů (vajíček, larev atd.) v definovaném množství stolice (např. 1 gram) (Pontes *et al.*, 2003; Cringoli *et al.*, 2010; Glinz *et al.*, 2010; Rinaldi *et al.*, 2011).

Imunologické metody se řadí mezi metody nepřímé. Základním principem těchto metod je detekce specifických protilátek v krvi (případně ve sklivci nebo mozkomíšním moku), které jsou produkovány hostitelem jako reakce na přítomnost antigenů parazita. Podle titrů jednotlivých skupin protilátek (např. IgE, IgG, IgM) je možné odlišit akutní fázi infekce od chronické (Keiser and Utzinger, 2009). Nejčastěji využívané imunologické metody jsou ELISA, nepřímá hemaglutinace nebo Western blot. Tyto metody se používají převážně při diagnostice tkáňových nebo krevních helmintóz, např. filariózy, echinokokózy (Ottesen *et al.*, 1977; Gottstein, 1992). Největším problémem imunologických testů je jejich nízká specifita způsobená zkříženou reaktivitou (Keiser and Utzinger, 2009).

Metody molekulární diagnostiky, na které je tato práce zaměřená, jsou podrobněji přiblíženy v samostatné kapitole (viz 3.2.1).

Tab. 1. – Přehled metod využívaných v diagnostice helmintóz (Peruski and Peruski, 2003; Garcia, 2009; Keiser and Utzinger, 2009; Gordon *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2011).

Diagnostické metody	Výhody	Nevýhody	Příklady použití u helmintóz
Mikroskopické metody	Rychlost, pracovní i cenová nenáročnost, kvantifikace (určení parazitémie), možnost diagnostiky většího spektra parazitů	Nízká specifita a senzitivita, detekce pozdní fáze infekce, nutnost zkušeného pozorovatele	Faust <i>et al.</i> , 1939; Gonçalves <i>et al.</i> , 2003; Pontes <i>et al.</i> , 2003; Sager <i>et al.</i> , 2006; Glinz <i>et al.</i> , 2010
Imunologické metody	Senzitivita, rozlišení fáze infekce	Nízká specifita (zkřížené reakce), nemožná detekce časných fází infekce	Hamilton <i>et al.</i> , 1998; Zhang <i>et al.</i> , 2003; Eamsobhana and Yong, 2009
Molekulární metody	Vysoká senzitivita a specifita, rychlost, detekce v časných fázích infekce, možná kvantifikace	Vyšší cena, optimalizační náročnost, časté kontaminace	Yamasaki <i>et al.</i> , 2004; ten Hove <i>et al.</i> , 2008; Alasaad <i>et al.</i> , 2011; Fink <i>et al.</i> , 2011

3.2.1 Molekulární metody

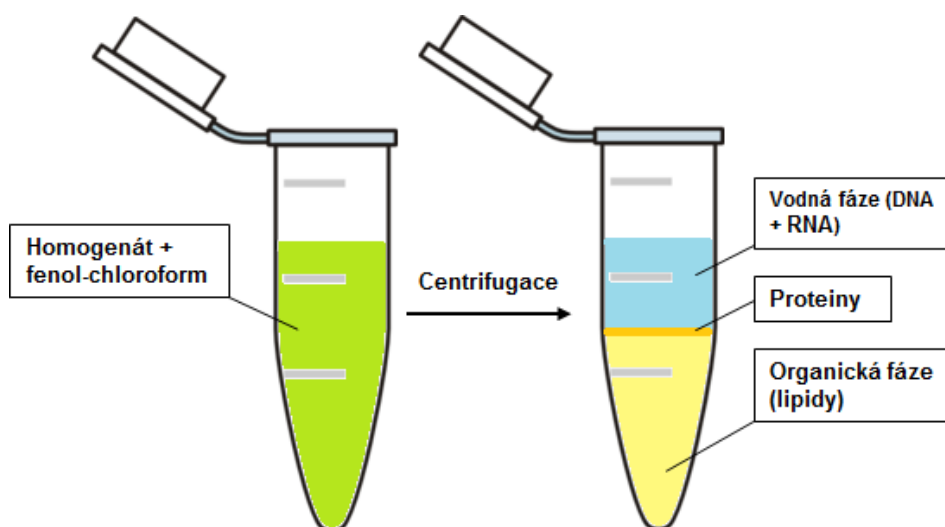
Nejčastěji používané molekulární diagnostické metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR). Základním principem těchto metod je zachycení a amplifikace specifického úseku cizorodé (parazitární) DNA, který je následně porovnán s referenčními sekvencemi, díky čemuž je možné přiřadit sekvenci ke konkrétnímu druhu nebo poddruhu organismu (Alasaad *et al.*, 2007; Lawton *et al.*, 2011). Molekulární metody se vyznačují především rychlostí a vysokou senzitivitou i specifikou (Gordon *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2011). Během posledních několika let došlo k velkému rozvoji molekulárních metod zaměřených na diagnostiku parazitárních nákaz, zvýšila se i jejich senzitivita, specifita a multiplicita s přibývajícím množstvím diagnostikovatelných patogenů (Tavares *et al.*, 2011; Reslová *et al.*, 2017a).

- **Izolace DNA**

Zásadním předpokladem úspěšné aplikace molekulárních metod je izolace (extrakce) DNA ze vzorku diagnostikovaného hostitele, kde parazitární DNA, pokud je ve vzorku přítomna, následně slouží jako templát v polymerázové řetězové reakci (PCR). Izolovat DNA ze vzorku je možné několika postupy, všechny však zahrnují podobné fáze. V první fázi izolace (**přípravná fáze**) je důležité vzorek dobře homogenizovat, čehož lze docílit různými postupy, např. rozdrcením vzorku v třecí misce po zmražení tekutým dusíkem, použitím mechanického homogenizátoru, BeadBeateru nebo sonikací (Blin and Stafford, 1976; Matheson *et al.*, 2014). K homogenátu jsou následně přidány lyzační roztoky nebo proteinázy (nejčastěji Proteináza K), většinou se však používají obě tyto složky zároveň a jejich vlivem dochází k rozvolnění tkání díky lýzi buněk. Přítomné detergenty rozrušují fosfolipidové membrány a proteinázy zas degradují veškeré proteiny, čímž je docíleno uvolnění DNA z buňky. V druhé fázi (**izolační fáze**) jde především o oddělení nukleových kyselin od ostatních buněčných složek (proteiny, lipidy, buněčné zbytky) např. s využitím organických látek, silikátové membrány či magnetických kuliček. Třetí fáze (**purifikační fáze**) už zahrnuje postupy zaměřené na přečištění uvolněné DNA, především je zaměřena na odstranění takových složek ze vzorku, které by mohly inhibovat následnou PCR, nejčastěji s využitím ethanolu (Miller *et al.*, 1999; Nishiguchi *et al.*, 2002; Dhaliwal, 2013). Nejvyužívanějšími metodami izolace DNA jsou fenol–chloroformová extrakce a komerční kity.

Fenol–chloroformová extrakce: Tato metoda je založená na rozdělení směsi na organickou a vodnou fázi, kde organická fáze obsahuje proteiny a lipidy, zatímco vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny (**Obr. 2**) (Sambrook and Russell, 2001; Guo *et al.*, 2012).

Obr. 2. Schéma fenol-chloroformové extrakce DNA.



Komerční „kolonkové“ kity: Časově i manuálně méně náročnou metodou je využití komerčně dostupných izolačních kitů. Jejich výhodou je obrovská variabilita použití pro specifický vstupní vzorek (např. kity na izolaci DNA ze stolice, z krve, z tkání), čímž je možné docílit vyšších výtěžků i čistoty DNA. Izolace probíhá v kolonce, ve které je umístěna silikátová membrána. Základním principem je navázání nukleových kyselin na tuto membránu, zatímco ostatní složky homogenátu protečou skrz. K navázání dochází důsledkem negativního náboje DNA současně s vlivem vysokého obsahu iontů v použitých pufrech (Melzak *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2000). Takto navázané nukleové kyseliny se mohou promývat ethanolem nebo roztoky s vysokým obsahem iontů. Eluce probíhá přidáním roztoku s nízkým obsahem iontů včetně H₂O (Melzak *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 2000; Cady *et al.*, 2003; Aryeetey *et al.*, 2013).

Komerční kity využívající magnetické částice: Princip této metody je založen na navázání molekul DNA na kuličkové nosiče s magnetickým jádrem. Tyto kuličky mají na svém povrchu syntetický polymer, který váže DNA různými způsoby, např. elektrostaticky nebo na základě rozdílu iontového složení či pH. Na tyto kuličky také mohou být navázány krátké oligonukleotidy, které umožní vazbu pouze specifických úseků DNA. Vložením vzorku do magnetického pole jsou molekuly DNA separovány od ostatních buněčných složek, které mohou být bez problému odstraněny. DNA je z kuliček uvolněna přidáním roztoku s nízkým obsahem iontů (Hawkins, 1999; Saiyed *et al.*, 2006; Tan and Yiap, 2009).

Komerční kity využívající „anion-exchange“ materiály: Základem je nejčastěji navázání negativně nabitě DNA na kladně nabitou diethylaminoethyl celulózu (DEAE). Tato vazba je velice odolná vůči změnám pH nebo iontového složení prostředí (Tan and Yiap, 2009; Dhaliwal, 2013).

Chelex 100: Extrakce DNA pomocí Chelex 100 je velice levná a rychlá metoda, kde polymery styrendivinylbenzenu tvořící Chelex 100 vážou různé ionty kovů včetně Mg²⁺, který slouží jako kofaktor nukleáz. Takto jsou tyto enzymy inhibovány a DNA je chráněna před degradací. Tato metoda nevyžaduje přidávání žádných lyzačních roztoků, k lýzi buněk dochází působením vysokých teplot (až 100 °C) (Walsh *et al.*, 1991; Bio-Rad Laboratories, 2000; Tan and Yiap, 2009; Dhaliwal, 2013).

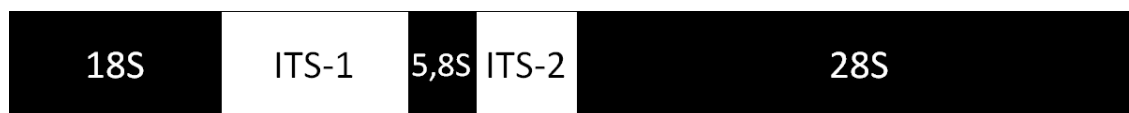
Gradientová centrifugace v roztoku chloridu cesného (CsCl): Tato metoda je založená na vytvoření koncentračního gradientu v roztoku chloridu cesného centrifugací při vysokých otáčkách, v závislosti na struktuře molekuly DNA (zastoupení A/T a G/C párů; délka sekvence, struktura DNA). Postupu se využívá např. i pro oddělení mtDNA od jaderné DNA (Tan and Yiap, 2009; Quispe-Tintaya *et al.*, 2013).

- **Molekulární markery**

Tento termín vyjadřuje specifické nukleotidové sekvence, které jsou vhodné pro druhovou determinaci organismů na základě genetické variability. S jejich pomocí můžeme rozlišit buď jednotlivé druhy (mezidruhové molekulární markery), nebo zástupce jednotlivých podrodů v rámci jednoho druhu (vnitrodruhové molekulární markery). Pro taxonomické studie, ale i diagnostické účely, se nejčastěji využívají mitochondriální (mtDNA) a ribozomální (rDNA) DNA (Hillis and Dixon, 1991; Le *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003; Nolan and Cribb, 2005; Vilas *et al.*, 2005; Littlewood *et al.*, 2006). Z diagnostického hlediska jsou pak velice významnými molekulárními markery repetitivní sekvence (Hamburger *et al.*, 1991; Benson, 1999). Molekulární markery a metody použité v diagnostice motolic jsou shrnuty v **Tab. 2**.

Jaderný **ribozomální genom** eukaryot je složen z několika stovek tandemových repetic, které zahrnují geny pro malou (18S rRNA) a velkou (5S; 5,8S a 28S rRNA) podjednotku ribozomu. Geny 18S; 5,8S a 28S rRNA od sebe odděluje "Internal transcribed spacer" (ITS1 a ITS2), který má regulační funkci při transkripci; a všechny tyto úseky jsou přesně uspořádány (**Obr. 3**). Všechny výše zmíněné úseky ribozomální DNA jsou často používány pro taxonomické studie (Hillis and Dixon, 1991; Nolan and Cribb, 2005).

Obr. 3. Schéma uspořádání ribozomální DNA (upraveno dle Hillis and Dixon, 1991).



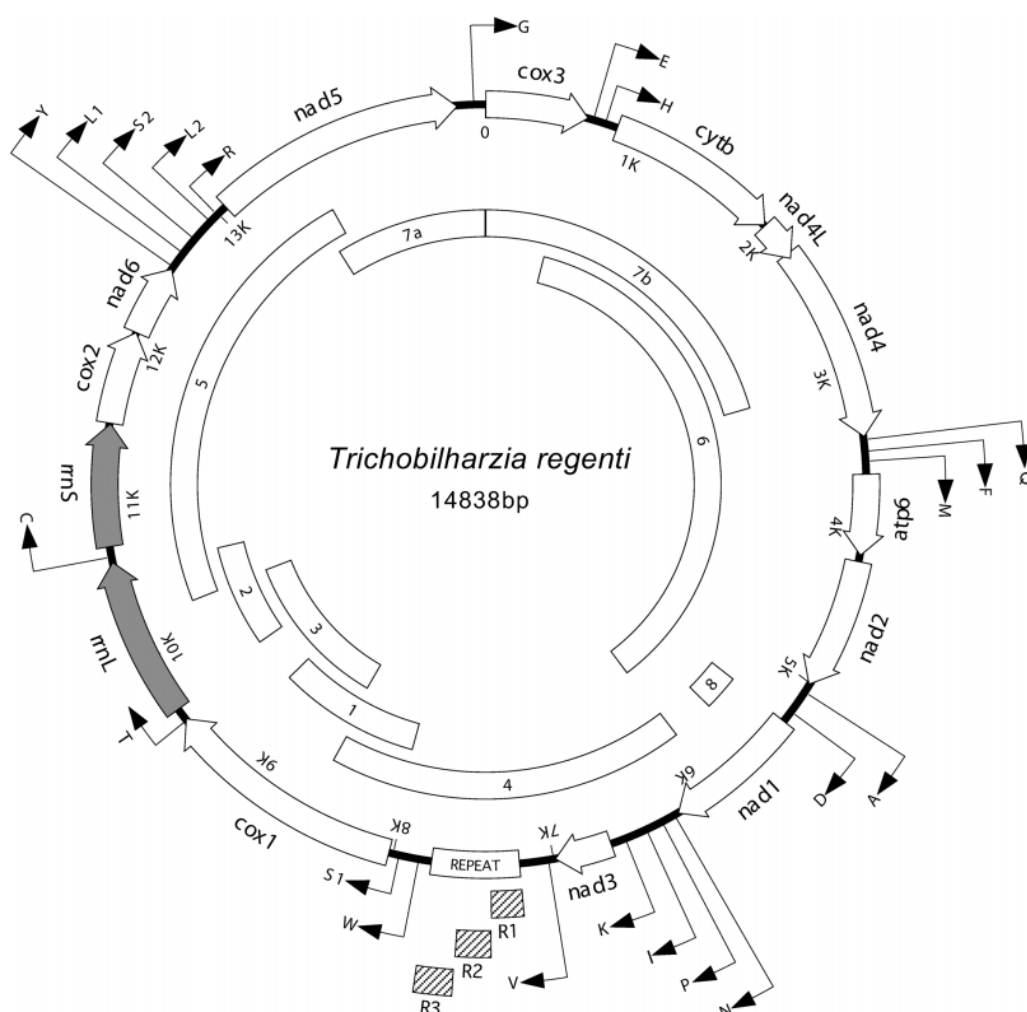
Ribozomální DNA zahrnuje oblasti od vysoce konzervovaných (18S rRNA) přes mírně konzervované (28S rRNA) až po vysoce variabilní (ITS1 a ITS2). Ačkoliv jako markery slouží i konzervované úseky (Hanelt *et al.*, 1997; Kumagai *et al.*, 2010; Tong *et al.*, 2015), z důvodu vysoké sekvenční variability (i v rámci jednoho druhu) jsou v diagnostice využívány především oblasti ITS (Nolan and Cribb, 2005; Meurs *et al.*, 2015; Schunk *et al.*, 2015).

Oblast ITS1 také využil Dvořák *et al.* (2002) pro rozlišení 3 druhů ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* (*T. regenti*, *T. szidati*, *T. franki*). Ve srovnání s oblastí ITS2, vykazovala oblast ITS1 mnohem větší mezidruhovou variabilitu. Prokazatelné rozdíly byly patrné v délce této oblasti, ale také v jejich nukleotidových sekvencích. Tyto odlišnosti byly způsobeny především výskytem rozdílných počtů a struktur repetitivních sekvencí v ITS1 mezi jednotlivými druhy (Picard and Jousson, 2001; Dvořák *et al.*, 2002). Na základě těchto repetic byly navrženy primery specifické pouze pro druh *T. regenti*, které by mohly sloužit k diagnostice tohoto neurotropního druhu (Dvořák *et al.*, 2002). V diagnostice ptačích schistosom je ribozomální DNA využívána poměrně často (Ferté *et al.*, 2005; Semyenova *et al.*, 2005; Jouet *et al.*, 2008; Yakhchali *et al.*, 2016).

Mitochondriální genom se skládá z přibližně 13-16 kbp dlouhé cirkulární DNA. Mitochondriální DNA (mtDNA) je maternálně dědičná, nedochází u ní k rekombinaci, a proto si zachovává vysoce konzervovanou strukturu v rámci druhu. Výskytem četných mutací je naopak vhodná pro rozlišení různých druhů i poddruhů a je tedy především využívána jako molekulární marker ve fylogenetických studiích (Le *et al.*, 2000a; Le *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003). Nejvyužívanějšími markery jsou pak geny cytochrom oxidázy c (cox) a NADH dehydrogenázy (nad), především pak cox1 a nad1 (Le *et al.*, 2000b; Le *et al.*, 2002; Semyenova *et al.*, 2006).

Pro účely diagnostiky, molekulární ekologie, populační a fylogenetické studie charakterizoval Webster *et al.* (2007) mitochondriální genom *T. regenti* (**Obr. 4**) a Semyenova *et al.* (2017) mitochondriální genom *T. szidati*. Na základě sekvenční diverzity cox1 bylo využito tohoto genu jako molekulárního markeru ve fylogenetických studiích, a to jak v rámci čeledi Schistosomatidae, tak i v rodu *Trichobilharzia* (Lockyer *et al.*, 2003; D. Jouet *et al.*, 2010b).

Obr. 4. Schéma mitochondriálního genomu *T. regenti* (Webster *et al.*, 2007). Vnější kruh: jednotlivé geny, vnitřní kruh: navržené primery s výslednými amplikony; černé šipky: jednotlivé aminokyseliny.



Repetitivní sekvence jsou hojně zastoupené v genomu všech eukaryotických organismů a mohou zaujímat i více než polovinu celé genomové DNA. Tyto sekvence mají jak strukturní, tak regulační funkci, převážně se tedy jedná o nekódující sekvence, které podléhají vysoké míře mutací (Ugarkovic, 2005; López-Flores and Garrido-Ramos, 2012; Biscotti *et al.*, 2015). Právě kvůli rychlé evoluci těchto úseků DNA a jejich vysokému zastoupení v genomu jsou repetitivní sekvence vhodnými molekulárními markery pro diagnostické účely (Hamburger *et al.*, 1991).

Jako vhodný molekulární marker charakterizoval Hamburger *et al.* (1991) 121 bp tandemově repetitivní sekvenci (Sm1-7) u *S. mansoni*. Podobnou, 121 bp tandemově repetitivní sekvenci (Dra1), se také podařilo charakterizovat v genomu *S. haematobium* (Hamburger *et al.*, 2001). Tato sekvence zahrnuje 12 % celého genomu *S. mansoni* a asi v 15 % celého genomu *S. haematobium*. Obě tyto sekvence jsou hojně využívány v diagnostických metodách, především kvůli své vysoké detekční senzitivitě (viz **Tab. 2**), např. Ferrer *et al.* (2015) dokázali pomocí specifických primerů pro sekvenci Sm1-7 detekovat i 10 attogramů (ag) genomové DNA *S. mansoni*. Pro porovnání genom jedné buňky *S. mansoni* obsahuje přibližně 580 fg DNA, což je 50 000x více, než byl detekční limit použité metody.

U ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* byla také charakterizována tandemově repetitivní sekvence (ToSau3A) o délce přibližně 396 bp (Hertel *et al.*, 2002). Tato sekvence byla popsána u *T. szidati* (*T. ocellata*), vyskytuje se však i druhů *T. regenti* a *T. franki* a zaujímá velkou část jejich genomu (1,5 % genomu *T. szidati*; 2 % genomu *T. regenti* a 1 % genomu *T. franki*). U navržených primerů nebyla pozorována zkřížená hybridizace se *S. mansoni*. Z důvodu nízké mezidruhové variability (shoda ve více než 92%), je však tato repetitivní sekvence využitelná pouze pro rodově specifickou diagnostiku.

• PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR = Polymerase chain reaction) je molekulární metoda, kterou poprvé definoval po úspěšné aplikaci Karry B. Mullis roku 1985 (Saiki *et al.*, 1985). Zásadním krokem pro tuto reakci bylo využití termostabilní DNA polymerázy, dnes se nejběžněji používá Taq polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988).

Hlavní princip této metody je založen na mnohonásobné amplifikaci (v řádech milionů) nukleotidové sekvence, přičemž je daná sekvence ohraničená z každé strany krátkými specifickými oligonukleotidovými úseky (primery). Samotná amplifikace je pak založena na syntéze nového komplementárního vlákna pomocí DNA polymerázy. Průběh reakce je regulován změnami teplot, které se opakují v cyklech, kde dnes tuto práci zastávají k tomu určené přístroje – thermocyclery (Mullis *et al.*, 1986; Mullis, 1990; Alberts *et al.*, 2008; Šmarda *et al.*, 2008; Clark, 2010).

- **Diagnostické metody založené na PCR**

Konvenční PCR: Tato metoda je založená na použití specifických primerů, kdy dojde k ohraničení cílové sekvence a k její následné amplifikaci pomocí DNA polymerázy. Pro vyhodnocení výsledků je následně nutné produkty PCR separovat, nejčastěji za pomoci gelové elektroforézy (Alberts *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2008; Šmarda *et al.*, 2008).

Gelová elektroforéza je jednoduchá a levná metoda, kterou lze rychle separovat nukleové kyseliny (případně i proteiny) a to na základě rychlosti pohybu v elektrickém poli. Elektroforéza se provádí na gelových nosičích, nejčastěji agarózových, ze kterých je následně možné amplifikony DNA po obarvení vyříznout, izolovat a dále s nimi pracovat (Williams, 2001; Campbell *et al.*, 2008; Šmarda *et al.*, 2008; Haines *et al.*, 2015). Výsledkem gelové elektroforézy je přítomnost či nepřítomnost amplifikované DNA ve vzorku a její následné porovnání s referenčními vzorky (Šmarda *et al.*, 2008).

Konvenční PCR nemá oproti ostatním odvozeným metodám žádné zásadní výhody, kromě nižší finanční nákladnosti. Nevýhodou je relativně větší časová náročnost v důsledku nutnosti využití gelové elektroforézy, nižší senzitivita a také to, že tato metoda není kvantitativní (Lin *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2011).

S pomocí konvenční PCR proběhlo několik experimentů zaměřených na potvrzení výskytu schistosom (lidských i ptačích) v přírodních vodních zdrojích. U lidských schistosom, konkrétně u *S. mansoni*, se této problematice věnovali Hamburger *et al.* (1998). V experimentu přidali do vzorku vody definovaný počet cercárií a jako templát pro PCR použili usazenou část po přefiltrování tohoto vzorku vody. Na základě amplifikace 121 bp repetitivní sekvence Sm1-7, se experimentálně podařilo stanovit detekční limit - 1 cercárie v 5 litrech vody. Hertel *et al.* (2004) dokázali na základě stejné sekvence detekovat 1 cercárii *S. mansoni* přidanou do 0,05g planktonu. Obdobný experiment provedli Hertel *et al.* (2002) s cercáriemi *T. szidati*, kde se jim podařilo detekovat 1 cercárii přidanou do 0,5 g planktonu pomocí 396 bp repetitivní sekvence Sau3A. V praxi toho využili Schets *et al.* (2010), kteří takto testovali vzorky vody (10 litrů) z jezera s hlášeným výskytem cercárie dermatitidy, za použití specifických primerů pro oblasti ITS2 a repetitivní sekvenci Sau3A *Trichobilharzia* spp. Z celkových 79 vzorků vody se podařilo amplifikovat parazitární DNA pouze u 6 z nich a vždy se jednalo o Sau3A repetitivní sekvenci.

Real-time PCR: Metoda známá také jako kvantitativní PCR (qPCR), je založená na propojení klasické polymerázové řetězové reakce s fluorometrem, je pro ni tedy potřebný speciální thermocycler. Jak již oba používané názvy napovídají, touto metodou je možné kvantifikovat množství DNA v reálném čase (Wong and Medrano, 2005; Šmarda *et al.*, 2008).

Základním principem je použití fluoroforu vázajícího se na amplifikované úseky DNA, čímž dochází k emisi světla a síla fluorescenčního signálu odpovídá množství amplifikované

DNA (Heid *et al.*, 1996). Fluorofory se dají použít dvojího typu, buď nespecifické, které se váží na dvoušroubovici DNA (např. SYBR® Green) nebo specifické pro amplifikovanou sekvenci (tzv. próby). Nespecifické fluorofory jsou samozřejmě levnější a bez nutnosti optimalizace, na druhou stranu se však vážou na veškerou dsDNA včetně nespecifických produktů, jakými jsou např. vzniklé dimery primerů tzv. homodimery nebo heterodimery (Marshall, 2004; Taylor *et al.*, 2010). Těmto problémům se dá předejít ihned v počátku vhodným designováním primerů, za použití různých softwarů, např. PrimerQuest, OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy *et al.*, 2008).

Samotná reakce se dá rozdělit na 3 hlavní fáze. **Časná lineární fáze**, při které sice dochází k amplifikaci DNA, ale emitovaný fluorescenční signál je na tak nízké úrovni, že nepřevyšuje fluorescenci pozadí. **Exponenciální fáze**, kdy dochází k vysokému nárůstu signálu vlivem exponenciální amplifikace DNA a **fáze plató**, kdy nedochází k nárůstu produktu, a tedy ani nárůstu fluorescenčního signálu, důsledkem vyčerpání volných reaktantů (Tichopad *et al.*, 2003; Wong and Medrano, 2005).

Pro ověření specifity produktů se využívá analýzy křivky tání („melting curve“). Jedná se o metodu, při které je po průběhu samotné PCR postupně zvyšována teplota a zároveň se zaznamenává síla fluorescenčního signálu. Analýza je založena na momentu, kdy dochází k denaturaci dsDNA produktu a tím k vyvázání fluoroforu, což způsobí měřitelný pokles signálu (Taylor *et al.*, 2010; Tsiatis *et al.*, 2010). Tento moment je detekován a přiřazen k určité teplotě, teplotě tání (T_m), kde rozdílnost těchto teplot představuje diferencující faktor pro jednotlivé produkty. Ideálně by se tedy v každé reakci měl vyskytovat pouze jeden tento moment, který by měl teplotou odpovídat referenčním hodnotám (Taylor *et al.*, 2010). To, při jaké teplotě dojde k denaturaci DNA je závislé na délce a nukleotidovém složení produktu, a to především na zastoupení G/C párů, které zvyšují teplotu denaturace důsledkem přítomnosti trojitě vodíkové vazby (Nick, 2014). Pro ověření specifity je také možné využít gelové elektroforézy (Taylor *et al.*, 2010).

Pro provedení kvantifikace DNA je nejprve nutné vytvořit standardní křivku pro danou sadu primerů. Jedná se o křivku, která využívá známé hodnoty koncentrace DNA templátu (standards). Tyto standardy se nejčastěji připravují desítkovým nebo dvojkovým ředěním standardu s nejvyšší koncentrací. Každému standardu o určité koncentraci DNA pak odpovídá daná hodnota C_q („quantification cycle“). Hodnota C_q vyjadřuje číslo cyklu, kdy fluorescenční signál překročí hodnoty emitované pozadím (Heid *et al.*, 1996; Bustin *et al.*, 2009; Lefever *et al.*, 2009) a těmto hodnotám pak v grafu odpovídají jednotlivé body. Na základě těchto bodů provedeme regresní analýzu, která nám definuje funkci přímky lineární regrese. Pokud následně dosadíme hodnoty C_q náhodného vzorku do této rovnice (rovnice standardní křivky), stanovíme tak koncentraci DNA v daném vzorku (Heid *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2010).

Hlavní výhodou qPCR je tedy kvantifikace produktu a dále pak její automatizace, kde není nutné provádět gelovou elektroforézu. Tato metoda je také obvykle rychlejší, protože

se pracuje s krátkými amplikony (obvykle okolo 200 bp), proto stačí aplikace kratších časů jednotlivých cyklů. Na druhou stranu je však tato metoda poměrně cenově náročná, a to také v souvislosti se zpracováním všech vzorků v tripletech za účelem snížení chybovosti metody (Gordon *et al.*, 2011).

Gordon *et al.* (2015) se pokusili srovnat citlivost mikroskopické metody Kato-Katz s molekulární metodou qPCR v případě 560 vzorků lidské stolice potenciálně obsahující vajíčka a cfDNA *S. japonicum*. S využitím Kato-Katz byla určena prevalence nákazy 22,9 % s průměrnou hodnotou 11,5 vajíček na gram stolice (EPG), zatímco prevalence dle výsledků qPCR činila 90,2 % s průměrnou hodnotou 36,5 EPG. Z výsledku vyplývá, že ačkoliv jsou obě metody kvantitativní, qPCR byla v tomto případě citlivější.

HRM: Metoda HRM (High resolution melting) vychází z analýzy křivky tání („melting curve“), která je popsána výše u odstavce Real-time PCR. Základním principem této metody je sledování průběhu denaturace DNA produktů PCR, kde křivky tání probíhají v určitém trendu pro specifický produkt, a to v závislosti na odlišnostech v množství G/C párů, délce a nukleotidové sekvenci produktu (Wittwer *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2007). Ačkoliv mohou být teploty tání (T_m) pro více produktů totožné, analýzy křivky tání pomocí HRM mohou tyto produkty diferenciovat (Jin *et al.*, 2012).

Při navrhování primerů je důležité vybrat některé konzervované úseky, které budou zastoupeny u všech sledovaných parazitů (např. geny rDNA, mtDNA) a zároveň u nich bude na takto krátkých úsecích DNA dostatečná druhová variabilita. Výhodou této metody je relativní jednoduchost, kdy vše probíhá v jedné mikrozkušnici, a zároveň možnost diagnostikovat více druhů v jedné reakci (Wittwer *et al.*, 2003; Reed *et al.*, 2007; Reslová *et al.*, 2017b).

Na základě této metody byli Li *et al.* (2015) schopni odlišit 4 hlavní původce lidské schistosomózy (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium* a *S. mekongi*) od sebe, a to za pomoci přibližně 280 bp dlouhého úseku V4 regionu 18S rDNA, přičemž byla teplota tání u *S. japonicum* a *S. mekongi* totožná ($T_m = 83,65^\circ\text{C}$). Této metody také využili Radvánský *et al.* (2011) pro rozlišení 7 haplotypů motolice *Fascioloides magna* na základě polymorfismu v přibližně 439 bp dlouhém fragmentu cytochrom oxidázy 1 (cox1).

Multiplex PCR: Tato metoda, kterou popsal roku 1988 Chamberlain; vychází z klasické PCR, ale do samotné reakce jsou přidány více než jedny sady primerů a zároveň tedy může být amplifikováno více úseků DNA (Chamberlain *et al.*, 1988; Henegariu *et al.*, 1997). Výhodou této metody je diagnostika více druhů parazitů v jedné reakci např. diagnostikování nejběžnějších lidských střevních parazitů ze stolice (Taniuchi *et al.*, 2011) a redukce s tím spojených nákladů. Obrovskou nevýhodou je však vysoká náročnost optimalizace a dále pak nutnost gelové elektroforézy (Šmarda *et al.*, 2008; Gordon *et al.*, 2011).

Využitím této metody dokázali Kato-Hayashi *et al.* (2010) u myši rozlišit, ve vzorcích krevního séra a moči, 4 hlavní původce lidské schistosomózy (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. mekongi*) na základě jejich polymorfismu v genu pro cytochrom c oxidázu - podjednotku 1 (cox1).

Dnes se také můžeme setkat s využitím Multiplex PCR ve spojení s Real-time PCR (Multiplex Real-time PCR). Tato metoda je však poměrně náročná jak ze strany finanční, tak ze strany optimalizace. V tomto případě se používají spíše fluorescenčně značené specifické próby (Gunson *et al.*, 2008; ten Hove *et al.*, 2008), protože při použití nespecifických fluoroforů je pro vyhodnocení nutné použít další metody založené na křivce tání (např. HRM) (Kaewkong *et al.*, 2013). Metodu Multiplex Real-time PCR použili Won *et al.* (2016) pro diagnostiku 8 druhů střevních parazitů člověka (včetně motolic *Clonorchis sinensis* a *Metagonimus yokogawai*) ze vzorku stolice, navrhli tak významnou metodu pro epidemiologické populační studie.

Nested PCR: Základem této metody je použití dvou sad primerů, vnějších a vnitřních. Nejprve probíhá klasická PCR za využití vnějších primerů, které ohraničují specifickou sekvenci DNA. Produkt této reakce je použit jako templát pro následnou PCR, kde jsou použity primery vnitřní. Princip je tedy založen na nasedání vnitřních primerů na amplifikovanou sekvenci ohraničenou primery vnějšími (Šmarda *et al.*, 2008). Tato metoda je vysoce citlivá, přenesením PCR produktu první reakce se totiž nařadí případné inhibitory polymerace a sníží se i riziko nespecifických vazeb vnitřních primerů. Se zvýšeným počtem pipetování se však také zvyšuje riziko kontaminace. Nevýhodou je také nutnost použití gelové elektroforézy (Berry and Sarre, 2007; Šmarda *et al.*, 2008). Alternativou této metody je Semi-nested PCR, kdy je v druhé reakci použit jeden vnější primer z první reakce a jeden nový, vnitřní primer (Rubio *et al.*, 1999; Verweij *et al.*, 2001).

Martínez-Pérez *et al.* (2012) diagnostikovali experimentálně nakažené ovce motolicí *F. hepatica* v časně fázi infekce ze vzorků stolice a dokázali detekovat parazitární DNA už 2 týdny po infekci oproti konvenční PCR, kterou byla DNA detekována až 3. týden po infekci. Nested PCR také vykazovala 100% senzitivitu, podařilo se prokázat nákazu u všech 45 ovcí oproti konvenční PCR, která ji diagnostikovala pouze u 37 z nich (senzitivita 82,2%).

LAMP: Metoda LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) je metodou využívající kontinuální autoamplifikaci, kdy celá reakce probíhá při stabilní, neměnné teplotě (většinou 60-65 °C), čímž se liší od klasické PCR. Z toho důvodu je také využíván jiný typ DNA polymerázy s tzv. „displacing polymerase activity“, kdy samotná polymeráza může rozvolňovat dvoušroubovici DNA a komplementární vlákno nahrazovat vláknem novým (např. Bst polymeráza z bakterie *Bacillus stearothermophilus*), a není tak potřeba denaturace vyvolaná vysokou teplotou (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002).

Do reakce jsou hned na začátku přidány dvě sady specifických primerů, vnější a vnitřní. Tyto primery jsou navrženy tak, aby rozpoznaly šest odlišných oblastí cílové sekvence a zároveň na koncích amplikonů vytvářely jakési vlásenky (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002). Produktem je směs amplikonů různých délek, z toho důvodu nelze použít separační metody a výsledek je tedy konstatován na základě vizuálních signálů (zakalení, fluorescence) po přidání různých reaktantů přímo ve zkumavce (Tomita *et al.*, 2008; Mori and Notomi, 2009). Tato metoda má mnoho výhod, ale naopak i mnoho nevýhod. Obrovskou výhodou je nezávislost na specializovaných přístrojích (thermocycler) a reakce se proto může provádět např. ve vodní lázni nebo thermobloku. Další velkou výhodou, oproti ostatním metodám, je rychlost této metody, neboť nezabere více jak 1 hodinu. Taktéž je potřeba vyzdvihnout obrovskou specifitu a senzitivitu způsobenou použitím dvou sad primerů, kvůli kterým je však tato metoda velice náročná na optimalizaci (Notomi *et al.*, 2000; Nagamine *et al.*, 2002).

Pomocí metody LAMP dokázali Abbasi *et al.* (2010) diagnostikovat plže nakažené *S. mansoni* a *S. haematobium* už 1 den po vystavení přítomnosti miracidí. Jako diagnostické markery byly zvoleny 121 bp dlouhé tandemově repetitivní sekvence Sm1-7 a Dra1, u kterých byl stanoven detekční limit na 0,1 fg genomové DNA.

Luminex: Tato metoda je založená na kombinaci Multiplex PCR a průtokové cytometrie/fluorometrie s ohledem na použité nosiče. Nejdříve se provede Multiplex PCR podle standardního postupu. K výslednému produktu této reakce se přidají specifické primery s přesně definovaným krátkým přesahem, který slouží k hybridizaci s krátkými oligonukleotidovými úseky navázanými na kuličkových nosičích. Po nasednutí těchto primerů je vlákno DNA syntetizováno inkorporací značených nukleotidů. Následně jsou přidány polystyrenové nebo magnetické kuličky, které slouží jako nosiče. Tyto kuličky jsou značeny různým poměrem dvou fluoroforů (až 100 kombinací) a mají na svém povrchu navázané již zmiňované krátké specifické oligonukleotidy. Poté dojde k navázání fluorescenčně značených produktů PCR na tyto kuličky, které jsou pomocí speciálního přístroje analyzovány. Analýza probíhá buď na principu průtokové cytometrie, nebo v případě magnetických nosičů na základě jejich uspořádání do jedné vrstvy a fluorometrické analýze signálu u všech najednou. Analýza probíhá na dvou úrovních, na první je detekován fluorescenční signál kuličkových nosičů a určuje tedy, o jaký nosič (vzorek) se jedná (např. o jakého parazita, o jaký gen). Druhá detekuje množství fluorescenčního signálu odpovídající množství navázaných produktů na nosiči (Dunbar, 2006; Tavares *et al.*, 2011; Reslová *et al.*, 2017a).

Tato metoda tedy umožňuje v jedné reakci a jednom okamžiku analyzovat přítomnost až 100 různých sekvencí a také je kvantifikovat. Jedná se tedy o rychlou, přesnou a v součtu levnou metodu, která však vyžaduje speciální přístroj a poměrně náročnou optimalizaci (Dunbar, 2006; Tavares *et al.*, 2011). Metoda Luminex nebyla dosud použita k diagnostice motolic, avšak díky vysokému potenciálu této metody můžeme brzy předpokládat výskyt experimentů s jejím využitím.

RFLP-PCR: Metoda RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) je založena na náhodném sestřihu PCR produktu restrikcí endonukleázami. Ty štěpí DNA ve specifických místech, které jsou definovány přesnou a krátkou nukleotidovou sekvencí. Vyhodnocení probíhá za pomoci gelové elektroforézy, kde porovnáváme počet a délky fragmentů s referenčními vzorky pro daný druh či marker. Touto metodou lze tedy odlišit různé druhy a poddruhy na základě odlišnosti jejich genotypu bez znalosti jejich sekvence. (Bowles and McManus, 1993; Šmarda *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2011).

Metodu RFLP-PCR použil např. Boon *et al.* (2017), který sledoval možnost hybridizace dvou druhů schistosom, lidské *S. haematobium* a dobytčí *S. bovis*, v přírodě. Základem pro tento výzkum byla morfologicky atypická vajíčka nalezená v moči a stolici infikovaných lidí. Pomocí metody RFLP-PCR použité na předem amplifikované oblasti ITS a *cox1* se podařilo prokázat hybridizaci mezi oběma těmito druhy schistosom. Mezdruhovú hybridizace byla prokázána u vajíček morfologicky atypických i u těch, která byla morfologicky zařazena k jednomu nebo druhému druhu. Dnes se však tato metoda používá jen velmi ojediněle.

RAPD-PCR: Metoda RAPD (Random amplified polymorphic DNA) je jednoduchá metoda, díky které je možné porovnávat genotypy jakéhokoliv organismu s referenčními vzorky, a přitom není potřeba znát jeho sekvenci DNA. Princip je založený na použití krátkých nespecifických oligonukleotidů (okolo 10 bp), které se váží na různá místa genomové DNA. Výsledkem jsou různě dlouhé amplikony, které se porovnávají pomocí gelové elektroforézy (Williams *et al.*, 1990; Šmarda *et al.*, 2008; Kumar and Gurusubramanian, 2011).

Jak již bylo zmíněno, tato metoda je velice jednoduchá, levná, nepotřebuje žádné složité optimalizace a dokáže organismy determinovat do druhů i poddruhů. Nevýhodou však může být právě to, že jako referenční vzorek můžeme použít jiný poddruh daného organismu a výsledek tak považovat za falešně negativní. Dále pak tato metoda není příliš vhodná pro použití vzorků z terénu, neboť jakákoliv kontaminace jinými organismy způsobí zkreslené výsledky (Williams *et al.*, 1990; Monis and Andrews, 1998; Šmarda *et al.*, 2008; Kumar and Gurusubramanian, 2011).

Intapan *et al.* (2004) využili této metody pro rozlišení 5 druhů *Paragonimus* spp., což bylo předtím možné pouze morfologicky. Navrhli tak novou a přesnější determinační metodu. Tato metoda byla také často využívána pro prokázání genetické variability lidských schistosom v rámci druhu, a to mezi odlišnými hostiteli nebo jednotlivými subpopulacemi (Dabo *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 1999; Sire *et al.*, 2001a, 2001b). Stejně jako RFLP-PCR je dnes tato metoda na ústupu.

PCR-ELISA: Tato metoda je založena na kombinaci PCR a metody ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Reakce začíná klasickou amplifikací vybraného úseku DNA, kde jsou však pro její syntézu přítomny nukleotidy značené digoxigeninem (DIG). Následuje postup obdobný jako u metody ELISA, kde se tato směs amplikonů následně přidá do jamek s navázanými komplementárními oligonukleotidy, čímž dojde k hybridizaci. Do reakce se poté přidá anti-DIG peroxidáza, která vyvolá barevnou změnu v přítomnosti specifické DNA (Sue *et al.*, 2014).

Jedná se o jednoduchou, poměrně citlivou a semi-kvantitativní metodu, při které není potřeba specializovaných přístrojů (Sue *et al.*, 2014), přesto tato metoda není příliš využívána a bývá nahrazena qPCR. U motolic tuto metodu aplikoval Gomes *et al.* (2010) při použití 121 bp tandemově repetitivní sekvence Sm1-7 jako molekulárního markeru pro diagnostiku vzorků lidské stolice. Podařilo se mu stanovit detekční limit na 1,3 femtogramů (fg) genomové DNA *S. mansoni*, což odpovídá 0,15 vajíčkům v 1 g vzorku stolice.

Tab. 2. Příklady molekulárních metod použitých k diagnostice medicínsky a veterinárně významných motolic.

Molekulární metoda	Parazit	Amplifikovaná oblast (region)	GenBank anotační číslo	Reference
Konvenční PCR	<i>Schistosoma mansoni</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence Sm1-7	M61098	Hamburger <i>et al.</i> , 1991; Pontes <i>et al.</i> , 2003; Oliveira <i>et al.</i> , 2010
	<i>Schistosoma japonicum</i>	230 bp fragment repetitivní sekvence SjR2	AF412221	Fung <i>et al.</i> , 2012
	<i>Schistosoma haematobium</i>	121 bp repetitivní sekvence Dra1	DQ157698	Hamburger <i>et al.</i> , 2001
	<i>Fasciola hepatica</i>	405 bp fragment cytochrom oxidázy 1 (cox1)	X15613	Cucher <i>et al.</i> , 2006
	<i>Fasciola gigantica</i>	124 bp repetitivní sekvence	U11819	Velusamy <i>et al.</i> , 2004
	<i>Fascioloides magna</i>	152 bp fragment oblasti Internal transcribed spacer (ITS2) rDNA	EF534992	Karamon <i>et al.</i> , 2015
	<i>Clonorchis sinensis</i>	LTR Repetitivní sekvence CsRn1	AY013558	Cho <i>et al.</i> , 2013
	<i>Opisthorchis viverrini</i>	333 bp repetitivní sekvence	S80278	Wongratanacheewin <i>et al.</i> , 2001, 2002
	<i>Paragonimus westermani</i>	463 bp fragment ITS2	JN656201	Sugiyama <i>et al.</i> , 2002

PCR- ELISA	<i>S. mansoni</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence Sm1-7	M61098	Gomes <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. mansoni</i>	77 bp fragment ITS2	DQ677661	Schunk <i>et al.</i> , 2015; Al-Shehri <i>et al.</i> , 2018
Real-time PCR	<i>S. japonicum</i>	75 bp fragment NADH dehydrogenázy (nad1)	AF056291	Lier <i>et al.</i> , 2009; He <i>et al.</i> , 2018
		82 bp fragment nad1	AF056291	Gordon <i>et al.</i> , 2012, 2015
	<i>S. haematobium</i>	121 bp repetitivní sekvence Dra1	DQ157698	Cnops <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	77 bp fragment ITS2	AF503487, DQ677661	Meurs <i>et al.</i> , 2015
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence	M61098	Wichmann <i>et al.</i> , 2009
	<i>F. hepatica</i>	86 bp fragment ze 449 bp repetitivní sekvence	S67037	Schweizer <i>et al.</i> , 2007
	<i>F. hepatica</i> , <i>F. gigantica</i>	140 bp fragment ITS2	AM709612, AM900371	Alasaad <i>et al.</i> , 2011
	<i>C. sinensis</i>	157 bp fragment ITS1	JQ048621	Cai <i>et al.</i> , 2012
		64 bp fragment ITS2	EF688144	Kim <i>et al.</i> , 2009
	<i>O. viverrini</i>	333 bp repetitivní sekvence	S80278	Suksumek <i>et al.</i> , 2008
HRM	<i>S. japonicum</i> , <i>S. mekongi</i>	156 bp fragment 18S rDNA	FJ176682, U89871	Kongklieng <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i>	267 bp fragment cox1	JQ289741, JQ397397	Sady <i>et al.</i> , 2015
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. mekongi</i>	Přibližně 280 bp V4 region 18S rDNA	AY157226, AY157228, SMU65657, Z11976	Li <i>et al.</i> , 2015
	<i>F. magna</i>	Přibližně 439 bp cox1	EF534996– 98	Radvánský <i>et al.</i> , 2011
	<i>C. sinensis</i> , <i>O. viverrini</i>	165 bp a 209 fragmenty nad2	AY264851, EU443833	Kaewkong <i>et al.</i> , 2013
		82 bp fragment cox1	EU652408, KF577573	Cai <i>et al.</i> , 2014
Nested PCR	<i>S. mansoni</i>	18S rDNA	AJ223842	Hanelt <i>et al.</i> , 1997
	<i>S. japonicum</i>	303 bp fragment z repetitivní sekvence SjCHGCS19	FN356221	Guo <i>et al.</i> , 2012
		530 bp repetitivní sekvence Sja1	AF213692	Tong <i>et al.</i> , 2009
	<i>F. hepatica</i>	423bp fragment mtDNA	AF216697	J. Martínez-Pérez <i>et al.</i> , 2012
	<i>C. sinensis</i>	Gen CSCRA25-2F	AY586613	Parvathi <i>et al.</i> , 2007
	<i>O. viverrini</i>	508 bp fragment nad1	DQ119551	Lovis <i>et al.</i> , 2009
LAMP	<i>S. mansoni</i>	206 bp fragment z 620 bp repetitivní sekvence mtDNA	L27240	Fernández-Soto <i>et al.</i> , 2014
		225 bp fragment oblasti ITS2 a 28S rDNA	AJ223842	Gandasegui <i>et al.</i> , 2016
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	121 bp tandemově repetitivní sekvence	M61098, DQ157698	Abbasi <i>et al.</i> , 2010; Hamburger <i>et al.</i> , 2013
	<i>S. japonicum</i>	405 bp fragment 28S rDNA	Z46504	Kumagai <i>et al.</i> , 2010; Tong <i>et al.</i> , 2015
		230 bp fragment repetitivní sekvence SjR2	AF412221	Xu <i>et al.</i> , 2010

LAMP	<i>F. hepatica</i> , <i>F. gigantica</i>	Oblast 28S – 18S rDNA	GU903890, GU903891	Ai <i>et al.</i> , 2010
	<i>C. sinensis</i>	201 bp fragment genu pro cathepsin B3	AY273803	Cai <i>et al.</i> , 2010
		210 bp fragment cox1	AF181889	Rahman <i>et al.</i> , 2017
	<i>O. viverrini</i>	213 bp fragment ITS1	EU038151	Arimatsu <i>et al.</i> , 2012
	<i>Paragonimus westermani</i>	221 bp fragment ITS2	AF159604	Chen <i>et al.</i> , 2011
Multiplex PCR	<i>S. mansoni</i>	620 bp repetitivní sekvence	L27240	Jannotti-Passos <i>et al.</i> , 2006
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i>	94 bp a 143 bp fragment cox1	NC002545, AY157209	ten Hove <i>et al.</i> , 2008
	<i>S. haematobium</i> , <i>S. bovis</i>	543 bp a 306 bp fragment cox1	AY157209, FJ897160	Webster <i>et al.</i> , 2010
	<i>S. mansoni</i> , <i>S. haematobium</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. mekongi</i>	479 bp, 365 bp, 614 bp a 303 bp fragmenty cox1	AF216698, DQ157222, AF215860, AF217449	Kato-Hayashi <i>et al.</i> , 2010
	<i>F. hepatica</i>	85 bp tandemově repetitivní sekvence mtDNA	AP017707	Magalhães <i>et al.</i> , 2004
	<i>C. sinensis</i> , <i>O. viverrini</i>	612 bp a 1357 bp fragmenty mtDNA	DQ116944, DQ119551	Le <i>et al.</i> , 2006
	<i>C. sinensis</i> , <i>Metagonimus yokogawai</i>	360 bp fragment cox1	FJ381664, AB470519	Won <i>et al.</i> , 2016
RFLP-PCR	<i>S. japonicum</i>	474 bp fragment nad1	AF056289	Sørensen <i>et al.</i> , 1999
	<i>S. haematobium</i> , <i>S. bovis</i>	480 bp fragment ITS2	AF146037, AF146030	Barber <i>et al.</i> , 2000
		927 bp oblast ITS	JQ397414, FJ588862	(Boon <i>et al.</i> , 2017
		543 bp a 306 bp fragment cox1	FJ586241, FJ586242	
	<i>F. hepatica</i> , <i>F. gigantica</i>	618 bp fragment 28S rDNA	AJ440788, AJ440785	Marcilla <i>et al.</i> , 2002
	<i>F. hepatica</i> , <i>F. magna</i>	600 bp a 571 bp fragment ITS1	AB211236, EF534987	Králová-Hromadová <i>et al.</i> , 2008
		506 bp a 562 bp fragment ITS2	AB010974, EF534992	
	<i>F. hepatica</i> , <i>F. gigantica</i> , <i>F. magna</i>	Celá sekvence rDNA		Blair and McManus, 1989
	<i>Metagonimus</i> spp.	872 bp ITS1	KJ63174	Yu <i>et al.</i> , 1997a
		458 bp fragment cox1	AB470519	
RAPD-PCR	<i>Schistosoma</i> spp.	Použity různé krátké oligonukleotidy na celou genomovou DNA		Barral <i>et al.</i> , 1993; Dias Neto <i>et al.</i> , 1993; Kaukas <i>et al.</i> , 1994
	<i>F. hepatica</i> , <i>F. gigantica</i>			Ramadan and Saber, 2004; McGarry <i>et al.</i> , 2007
	<i>F. hepatica</i> , <i>Dicrocoelium dendriticum</i>			Morozova <i>et al.</i> , 2002
	<i>O. viverrini</i>			Wongsawad <i>et al.</i> , 2012
	<i>Paragonimus</i> spp.		Intapan <i>et al.</i> , 2004	
	<i>M. yokogawai</i>		Yu <i>et al.</i> , 1997b	

3.2.2 Cell-free DNA

Cell-free DNA (cfDNA; free circulating DNA) je extracelulárně lokalizovaná DNA, která se v nejvyšší koncentraci nachází v krvi, a to jak v krevním séru, tak i v plazmě (Jung *et al.*, 2010), ale může být nalezena i v dalších tělních tekutinách (např. sliny, mozkomíšní mok, lymfa, mateřské mléko, peritoneální tekutina, moč, stolice) (Fleischhacker and Schmidt, 2007). Původ vzniku cfDNA není úplně dobře znám, ale jako její hlavní zdroje jsou považovány procesy buněčné lýze (nekróza – neprogramovaná buněčná smrt a apoptóza – programovaná buněčná smrt) a dále pak aktivní uvolňování DNA z životaschopných buněk (Anker *et al.*, 1999; Stroun *et al.*, 2001; Gormally *et al.*, 2007). CfDNA se skládá z různě dlouhých fragmentů genomové DNA v závislosti na způsobu jejího uvolňování, kde krátké fragmenty (okolo 180 bp) odpovídají apoptickému vzniku, zatímco dlouhé fragmenty (přes 10 kbp) odpovídají vzniku nekrotickému (Jahr *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2008).

Ačkoliv byl výskyt této volné DNA v krevní plasmě člověka popsán už roku 1948 (Mandel and Metais, 1948), nebyla jí na dlouho dobu věnována pozornost. Až v 90. letech 20. století začal být o využití cfDNA v diagnostice vzrůstající zájem v důsledku velkého rozvoje molekulárních metod. Dnes je použití metod založených na detekci a následných analýzách cfDNA na rychlém vzestupu, a to především v prenatální diagnostice a onkologii (Goessl, 2003; Lo and Chiu, 2007), avšak s aplikací těchto metod se začíná experimentovat i v oboru parazitologie (Wichmann *et al.*, 2009; Weerakoon and McManus, 2016).

Volná DNA plodu cirkulující v krvi matky je využívána pro diagnostikování různých nemocí u plodu, nebo pro monitoring případných komplikací spojených s těhotenstvím (Lo *et al.*, 1998; Zimmermann *et al.*, 2005; Lo and Chiu, 2007; Chiu *et al.*, 2008; Lo and Chiu, 2008). V onkologii slouží cfDNA jako nádorový biomarker, protože při nádorovém onemocnění dochází k jejím kvantitativním i kvalitativním změnám oproti normálním fyziologickým hodnotám. Právě sledováním těchto změn lze nádorové onemocnění nejen diagnostikovat, ale i blíže charakterizovat; a následně monitorovat průběh léčby včetně časného zachycení případných relapsů onemocnění (Fiegl *et al.*, 2005; Bastian *et al.*, 2007; Gormally *et al.*, 2007; Paci *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010).

Rychlost degradace cfDNA byla sledována v několika experimentech, a to *in vitro* a také *in vivo*. Gauthier *et al.* (1996) injikoval myším DNA s radioaktivně značenými nukleotidy a sledoval jejich koncentraci v krvi v průběhu času. Po 10 min bylo více než 71 % (71–85 %) injikované cfDNA z krevního oběhu odstraněno, a to především játry, ale částečně také ledvinami. Lo *et al.* (1999) sledoval koncentraci cfDNA plodu v plazmě 8 žen po porodu pomocí metody qPCR. U 7 z 8 rodiček nebylo možné cfDNA plodu detekovat po 2 h od porodu, u jedné rodičky byla fetální cfDNA detekována, avšak její množství bylo už z 90 % redukováno. Poločas rozpadu cfDNA (snížení na 50 % koncentrace oproti času porodu) se pohyboval mezi 4–30 min. Oproti těmto výsledkům dokázala Yu *et al.* (2013) detekovat fetální cfDNA v plazmě 6 z 10 pacientek

i 24 h po porodu a u jedné dokonce po 48 h. Bylo však zjištěno že více než polovina veškeré fetální cfDNA je degradována již během první hodiny po porodu. Rozdíl v těchto případech bude pravděpodobně způsoben rapidním vývojem diagnostických metod.

Hlavními výhodami molekulárních metod založených na detekci cfDNA jsou vysoká senzitivita a specifita, rychlost, detekce v časných fázích infekce/nemoci/těhotenství, možná kvantifikace a relativně málo invazivní či neinvazivní získávání vzorku (Sozzi *et al.*, 2003; Tong and Lo, 2006; Wichmann *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010; Weerakoon and McManus, 2016).

- **Cell-free DNA v parazitologii**

V dnešní době se můžeme čím dál častěji setkat s diagnostickými metodami zaměřenými na detekci parazitární cfDNA, nejčastěji pak v diagnostice parazitů oběhového systému člověka, např. v rodech *Plasmodium* (Najafabadi *et al.*, 2014), *Trypanosoma* (Russomando *et al.*, 1992; Ngotho *et al.*, 2015), *Leishmania* (da Silva *et al.*, 2014), *Wuchereria* (Ximenes *et al.*, 2014) a *Schistosoma* (Wichmann *et al.*, 2009; Kato-Hayashi *et al.*, 2013, 2015). Právě v diagnostice krevních parazitů se použití těchto metod přímo nabízí, z důvodu konstantního kontaktu parazita s krví hostitele a s tím zvýšenou pravděpodobností výskytu jeho cfDNA právě v krvi a její distribucí pak i v dalších tělních tekutinách (Shiff, 2015; Weerakoon *et al.*, 2015; Weerakoon and McManus, 2016). Použití molekulárně-diagnostických metod založených na detekci cfDNA schistosom je shrnuto v **Tab. 3–5**.

Tab. 3. Přehled molekulárně-diagnostických metod založených na detekci cfDNA *S. mansoni* v lidských vzorcích.

Druh	Amplifikovaná oblast (marker)	Vzorek/senzitivita*	Použité metody	Reference
<i>Schistosoma mansoni</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence (GenBank: M61098)	Sérum 2/2 (100%)	Konvenční PCR	Pontes <i>et al.</i> , 2002
		Sérum 13/13 (100%)	Real-time PCR	Clerinx <i>et al.</i> , 2011
		Sérum 35/38 (92,1%)	Real-time PCR	Wichmann <i>et al.</i> , 2013
		Sérum 1/1 (100%) Mozkomíšni mok 1/1 (100%)	Real-time PCR	Härter <i>et al.</i> , 2014
		Sérum 23/24 (95,8%)	Konvenční PCR	Méabed <i>et al.</i> , 2016
		¹⁾ Plasma 22/22 (100%)	Real-time PCR	Wichmann <i>et al.</i> , 2009
		Stolice 58/60 (96,7%)	Konvenční PCR	Pontes <i>et al.</i> , 2003
		Stolice 37/38 (97,4%)	PCR-ELISA	Gomes <i>et al.</i> , 2010
		Stolice 25/34 (73,5%)	Konvenční PCR	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
		Moč 80/80 (100%)	Konvenční PCR	Enk <i>et al.</i> , 2012
		Moč 79/79 (100%)	Konvenční PCR	Lodh <i>et al.</i> , 2013
		Moč 57/58 (98,3%) ²⁾ 82/83 (98,8%)	Konvenční PCR	Lodh <i>et al.</i> , 2014
	350 bp fragment 28S rDNA (GenBank: AY157173)	Stolice 28/34 (82,4%)	Konvenční PCR	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
		Moč 8/8 (100%)	Konvenční PCR	Sandoval <i>et al.</i> , 2006
	877 fragment 28S rDNA (GenBank: AY157173)	Moč 8/8 (100%)	Konvenční PCR	Sandoval <i>et al.</i> , 2006
	94 bp fragment cytochrom oxidázy 1 (cox1) (GenBank: NC002545)	Stolice 58/70 (82,9%)	Multiplex Real-time PCR	ten Hove <i>et al.</i> , 2008
	77 bp fragment oblasti Internal transcribed spacer (ITS2) rDNA (GenBank: DQ677661)	Stolice 304/359 (84,7%) ³⁾ 82/92 (89,1%)	Real-time PCR	Meurs <i>et al.</i> , 2015
		Stolice 33/35 (94,3%)	Real-time PCR	Schunk <i>et al.</i> , 2015
		Stolice 125/147 (85,0%)	Real-time PCR	Al-Shehri <i>et al.</i> , 2018
		⁴⁾ Vaginální laváž 30/51 (58,8%)	Real-time PCR	Kjetland <i>et al.</i> , 2009

* Senzitivita byla vypočtena na základě porovnání s mikroskopickými metodami

¹⁾ Diagnostikována pouze *Schistosoma* spp.

^{2), 3), 4)} Smíšená nákaza *S. mansoni* a *S. haematobium*

Tab. 4. Přehled molekulárně-diagnostických metod založených na detekci cfDNA *S. haematobium* v lidských vzorcích.

Druh	Amplifikovaná oblast (marker)	Vzorek/senzitivita*	Použité metody	Reference
<i>Schistosoma haematobium</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence (GenBank: M61098)	¹⁾ Plasma 22/22 (100%)	Real-time PCR	Wichmann <i>et al.</i> , 2009
		Moč 70/70 (100%) ²⁾ 82/83 (98,8%)	Konvenční PCR	Lodh <i>et al.</i> , 2014
	121 bp repetitivní sekvence Dra1 (GenBank: DQ157698)	Moč 53/54 (98,1%)	Konvenční PCR	Ibironke <i>et al.</i> , 2011
		Moč 7/7 (100%) Stolice 11/11 (100%) Sérum 22/23 (95,7%)	Real-time PCR	Cnops <i>et al.</i> , 2013
	877 fragment 28S rDNA (GenBank: AY157173)	Moč 17/18 (94,4%)	Konvenční PCR	Sandoval <i>et al.</i> , 2006
	77 bp fragment oblasti internal transcribed spacer (ITS2) rDNA (GenBank: DQ677661)	Stolice 13/22 (59,1%) ³⁾ 82/92 (89,1%)	Real-time PCR	Meurs <i>et al.</i> , 2015
		Moč 132/148 (89,2%)	Real-time PCR	Obeng <i>et al.</i> , 2008
		Moč 95/95 (100%)	Real-time PCR	Vinkeles Melchers <i>et al.</i> , 2014
		Moč 152/225 (67,6%)	Real-time PCR	Pillay <i>et al.</i> , 2014
		Moč 71/71 (100%) Vaginální laváž 38/71 (53,5%)	Real-time PCR	Pillay <i>et al.</i> , 2016
		⁴⁾ Vaginální laváž 30/51 (58,8%)	Real-time PCR	Kjetland <i>et al.</i> , 2009
		Vaginální laváž 34/292 (11,6%)	Real-time PCR	Galappaththi-Arachchige <i>et al.</i> , 2018
	143 bp fragment cytochrom oxidázy 1 (cox1) (GenBank: AY157209)	Stolice 41/63 (65,1%)	Multiplex Real-time PCR	ten Hove <i>et al.</i> , 2008

* Senzitivita byla vypočtena na základě porovnání s mikroskopickými metodami

¹⁾ Diagnostikována pouze *Schistosoma* spp.

^{2), 3), 4)} Smíšená nákaza *S. mansoni* a *S. haematobium*

Tab. 5. Přehled molekulárně-diagnostických metod založených na detekci cfDNA *S. japonicum* v lidských vzorcích.

Druh	Amplifikovaná oblast (marker)	Vzorek/senzitivita*	Použité metody	Reference
<i>Schistosoma japonicum</i>	110 bp fragment ze 121 bp tandemově repetitivní sekvence (GenBank: M61098)	¹⁾ Plasma 22/22 (100%)	Real-time PCR	Wichmann <i>et al.</i> , 2009
	230 bp fragment repetitivní sekvence SjR2 (GenBank: AF412221)	Sérum 29/30 (96,7%)	LAMP	Xu <i>et al.</i> , 2010
		Sérum 53/53 (100%)	Konvenční PCR	Xu <i>et al.</i> , 2014
		Stolice 11/11 (100%)	Konvenční PCR	Fung <i>et al.</i> , 2012
	303 bp fragment z repetitivní sekvence SjCHGCS19 (GenBank: FN356221)	Sérum 42/43 (97,7%)	Nested PCR	Guo <i>et al.</i> , 2012
	254 bp fragment cytochrom oxidázy 1 (cox1) (GenBank: EU325891)	Sérum 10/10 (100%)	Konvenční PCR	Kato-Hayashi <i>et al.</i> , 2015
		Moč 14/14 (100%)		
	75 bp fragment NADH dehydrogenázy (nad1) (GenBank: AF056291)	Stolice 20/42 (47,6%)	Real-time PCR	Lier <i>et al.</i> , 2009
		Stolice 4/4 (100%)	Real-time PCR	He <i>et al.</i> , 2018
	82 bp fragment nad1 (GenBank: AF056291)	Stolice 16/16 (100%)	Real-time PCR	Gordon <i>et al.</i> , 2012
		Stolice 121/128 (94,5%)	Real-time PCR	Gordon <i>et al.</i> , 2015
		Sérum 101/108 (93,5%) Stolice 106/108 (98,1%) Moč 43/108 (39,8%) Sliny 28/108 (25,9%)	Droplet digital PCR	Weerakoon <i>et al.</i> , 2016
	668 bp fragment mezi cox2 a nad2 (GenBank: AF056291)	Stolice 16/16 (100%)	Konvenční PCR	Gordon <i>et al.</i> , 2012

* Senzitivita byla vypočtena na základě porovnání s mikroskopickými metodami

¹⁾ Diagnostikována pouze *Schistosoma* spp.

Původ parazitární cfDNA v tělních tekutinách hostitele je mnohem méně prostudovaný a objasněný než např. u nádorových onemocnění, předpokládá se však, že bude založen na totožném principu. Pravděpodobně se tedy bude jednat o DNA uvolněnou při apoptóze, nekróze a dále pak o DNA uvolněnou aktivní sekrecí či exkrecí (Weerakoon and McManus, 2016). U motolic byly doposud podobné studie prováděny pouze u původců lidských schistosomóz.

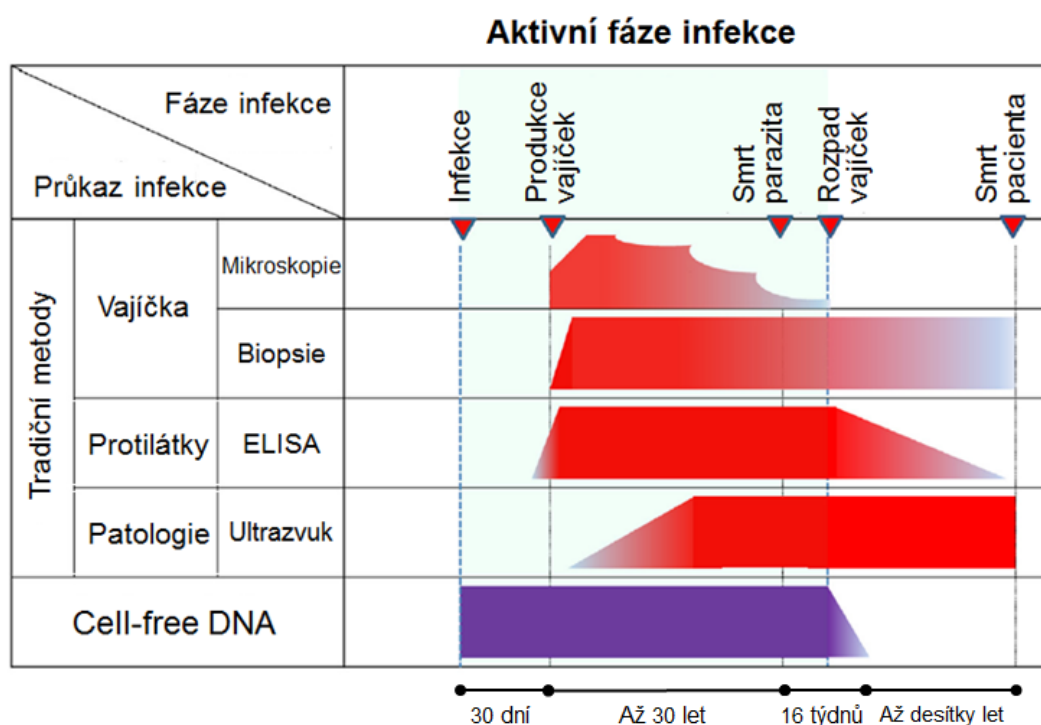
Právě u schistosom se této problematice věnoval např. Xu *et al.* (2013), kteří detekovali parazitární cfDNA v séru králíků infikovaných *S. japonicum*. U monosexuálních nákaz se jim podařilo pomocí detekce repetitivní sekvence SjR2 (GenBank: AF412221) diagnostikovat nákazu od 3. dne až do 3. týdne po infekci. Na základě těchto výsledků byla stanovena hypotéza, že diagnostika v časných fázích infekce je s největší pravděpodobností umožněna kvůli DNA

uvolňující se z uhynulých schistosomul, která byla usmrcena imunitním systémem během penetrace a migrace v hostiteli. Tuto hypotézu následně potvrdili Xu *et al.* (2017) ve svém dalším experimentu, kdy dokázali, že pokud při nákaze všechna schistosomula přežijí penetraci a následnou migraci v hostiteli, je hladina cfDNA parazita v séru hostitelských myší pod detekčním limitem. Obrovskou výhodou molekulárně-diagnostických metod je možná diagnostika časných fází infekce (**Obr. 5**), kde např. Kato-Hayashi *et al.* (2010) byl schopen detekovat cfDNA druhů *S. mansoni*, *S. japonicum* a *S. mekongi* ve vzorcích krevního séra a moči již 1 dpi za použití úseku cytochrom c oxidázy 1 (cox1) jako detekčního markeru.

Ve výsledcích Xu *et al.* (2013) se stejné detekční období (jako v časných fázích nákazy) prokázalo u monosexuální nákazy králíků po přeléčení praziquantelem, kdy bylo možné cfDNA detekovat od 2. dne po 3. týden po infekci. Obdobné výsledky již prezentovali Wichmann *et al.* (2009), kde za pomoci metody qPCR pozorovali zvýšení koncentrace cfDNA *S. mansoni* v plazmě myší již 5 dní po přeléčení. Z těchto výsledků lze docílit závěru, že po aplikaci léčby je původ parazitární cfDNA z uhynulých rozpadajících se dospělců.

Při nákazách králíků oběma pohlavími *S. japonicum* bylo možné detekovat parazitární DNA ještě 16. týden po infekci (Xu *et al.*, 2013). Předpokládá se, že během pozdních (chronických) fází nákazy se cfDNA vyskytuje v krvi hostitele ve zvýšené míře z důvodu DNA uvolňující se rozpadem inaktivovaných vajíček.

Obr. 5. Porovnání diagnostických metod lidských schistosom v průběhu infekce (dle Kato-Hayashi *et al.*, 2015 - upraveno; Harris *et al.*, 1984; Xu *et al.*, 2013).



4 Metodika

4.1 Modelové organismy

4.1.1 Ptačí motolice

Jako experimentální parazitické organismy byly použity ptačí motolice (*T. regenti* a *T. szidati*), jejichž životní cyklus je udržovaný na katedře Parazitologie PřF UK v Praze za využití plžů *Radix lagotis* jako přirozených mezihostitelů *T. regenti* a plžů *Lymnaea stagnalis* jako mezihostitelů *T. szidati*. Pro oba druhy slouží jako definitivní hostitelé kachny *Anas platyrhynchos f. domestica*.

4.1.2 Náhodní hostitelé

Jako náhodní hostitelé byly použity myši různých kmenů, a to v závislosti na provedení experimentu, především pak v souvislosti s četností odběrů krve (viz dále). V prvotních studiích sloužila jako experimentální zvířata myši kmenů BALB/c a ICR, ve finálních experimentech to pak byly kmeny C57BL/6 a ICR.

4.2 Získávání cercárií pro experimentální nákazy

Cercárie ptačích motolic druhů *T. regenti* a *T. szidati* byly pro experimentální nákazy kachen a myší získány z nakažených plžů (*Radix lagotis* a *Lymnaea stagnalis*) v chovech katedry Parazitologie PřF UK v Praze. Plži byli odebráni z akvária a přeneseni do menších sklenic s odstátou vodovodní vodou, kde byli na 1-2 hodiny vystaveni přímému světlu z lampičky (40 W), čímž bylo docíleno vylučování cercárií. Následně byla voda od plžů s vyloučenými cercáriemi přelita do baňky s úzkým hrdlem obalené alobalem, baňka byla doplněna odstátou vodovodní vodou až po horní okraj, který byl ze strany osvětlován lampičkou. Z důvodu úzkého hrdla baňky a pozitivní fototaxe cercárií, došlo k jejich hromadnému pohybu k hladině. Cercárie byly pak z hladiny Pasteurovou pipetou přeneseny do 50ml šroubovací centrifugační zkumavky a poté byl určen jejich počet v 1 ml vody pomocí mikroskopování dvaceti kapek z koncentrátu (objem 50 μ l). Zjištěním výsledné koncentrace cercárií v 1 ml vody, bylo možné vypočítat potřebný objem koncentrátu cercárií k docílení dané infekční dávky pro experimentální nákazy myší a kachen.

4.3 Experimentální nákazy

4.3.1 Experimentální nákazy kachen

Kachny *Anas platyrhynchos f. domestica* byly na 1 hodinu fixovány k nádobě tak, aby měly ponořené nohy ve vodě z vodovodu, do které byl přidán definovaný počet cercárií dle druhu motolice a designu experimentu (500–2000 cercárií). Nádoba byla zakryta alobalem, aby do ní nepronikalo světlo. Po uplynutí 1 hodinové expozice byly kachny z nádob uvolněny, barevně okroužkovány a opět vráceny do chovných klecí.

4.3.2 Experimentální nákazy myši

Myši (BALB/c, ICR a C57BL/6) byly na 30 min uzavřeny do kryté nádoby s otvory pro dýchání, do které byl přidán přibližně 1 cm vlažné vodovodní vody, aby proběhla urinace a defekace. Tyto tělní metabolity by totiž mohly negativně působit na cercárie a tím by mohla být ovlivněna celá experimentální nákaza. Obsah nádoby byl poté vyliť a opět naplněn přibližně 1 cm vodovodní vody, do které byl přidán definovaný počet cercárií. Do nádoby byly následně vloženy myši na 1 hodinu. Po uplynutí dané doby byly myši vyjmuty, barevně označeny na zádech a vráceny do chovných klecí.

4.4 Získání biologického materiálu a jeho zpracování

4.4.1 Vzorky krve

- **Odběr krve kachen**

Kachnám byla ethanolem vydezinfikována oblast jugulární žíly na krku, ze které se následně prováděl odběr krve pomocí inzulinové stříkačky Omnican® U-100 30G (B.Braun). V některých případech byla stejným způsobem odebrána krev z nohy z *aa. metatarsales dorsales*. Odebrané množství krve (300–500 µl) záviselo na velikosti kachny. Po odebrání krve bylo krvácení zastaveno tlakem prstu na místo vpichu, při odběru z nohy bylo krvácení zastaveno tekutým obvazem (URGO sprej) a kachna byla umístěna zpět do chovné klece. Odběry byly prováděny ve dvou experimentech, v optimalizačním (0 dpi; 1 dpi; 8 dpi; 15 dpi a 22 dpi) a vlastním experimentu (0 dpi; 1 dpi; 3 dpi; 7 dpi; 14 dpi a 21 dpi).

- **Odběr krve myši**

U myši byla krev získána pomocí techniky odběru z laterální žíly na ocase, jak popisuje Joslin (2009). Myš byla imobilizována uzavřením do fixátoru, který byl uzpůsoben tak, aby její ocas zůstal volný. Pro lepší viditelnost laterální žíly byl ocas na krátkou dobu (přibližně 30 s) ponořen do kádinky s vlažnou vodou (přibližně 35 °C). Poté byl ocas vytažen, osušen buničinou, vydezinfikován ethanolem a následně byla vydezinfikovanou žiletkou naříznuta jím procházející laterální žíla. Krev byla odsávána skleněnou kapilárou a pro lepší, kontinuální vytékání krve byl

ocas jemně masírován prsty. Celkové množství odebrané krve nepřesahovalo 100 µl, aby nebyl ohrožen život myši. Pro zástavu krvácení byl vyvinut tlak na poraněné místo suchou buničinou. Po kontrole, že došlo k zastavení krvácení, byla myš opět vrácena do chovné klece. Při opakovaných odběrech byly střídány laterální žíly na obou stranách ocasu a nový řez byl proveden o kousek blíže kořeni ocasu než ten předešlý. Odběry byly prováděny ve dvou experimentech, v optimalizačním (0 dpi; 1 dpi; 8 dpi; 15 dpi a 22 dpi) a vlastním experimentu (0 dpi; 1 dpi; 3 dpi; 7 dpi; 14 dpi a 21 dpi).

4.4.2 Vzorky krevního séra infikovaných lidí

Zpracovány byly vzorky krevního séra 10 lidí (9 mužů a 1 žena) infikovaných *T. szidati*. Jednalo se o osoby ve věku 23-52 let, které byly nakaženy během údržby jezírka u PřF UK v Praze. Cerkárie vylučované plži v tomto jezírku byly následně pomocí mikroskopických a molekulárních metod determinovány jako druh *T. szidati*. Krev byla všem účastníkům odebrána 1 hodinu po infekci (při prvních příznacích cercáriové dermatitidy), 7 dpi a 21 dpi. Všechny odběry krve byly provedeny proškolenou osobou a všichni účastníci souhlasili s poskytnutím těchto vzorků k vědeckým účelům.

4.4.3 Vzorky nervové tkáně

Mícha a mozek (bez mozečku) myši kmene C57BL/6 (samice, 10-14 týdnů) nakažených *T. regenti* a zdravých kontrolních zvířat byly mechanicky rozvolněny pomocí skleněného homogenizátoru a přefiltrovány přes buněčné sítko (průměr otvorů 70 µm). Nervová tkáň zbylá v sítku byla přesunuta do 300 µl 96% ethanolu a uložena při -20 °C až do následné izolace DNA. Vzorky byly odebrané z myši 0 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi a 28 dpi a pro analýzu je poskytl Mgr. Tomáš Macháček.

4.4.4 Vzorky hemolymfy

U druhu *R. lagotis* byla hemolymfa odebrána dohromady 35 plžů rozdělených do 4 skupin podle stadia a průběhu infekce. **Skupina A** (10 plžů) zahrnovala plže v pozdní fázi infekce (66 dpi). U této skupiny byla infekce prokázána vystavením plžů zdroji světla v oddělených nádobách s vodou, kde bylo přibližně po 20 minutách možné pozorovat vyloučené cercárie. Ve **Skupině B** (10 plžů) byli plži v časně fázi infekce (36 dpi), kdy ještě nedocházelo k vylučování cercárií (ověřeno dle postupu u skupiny A, viz výše), proto byla nákaza potvrzena pitvou a následným hledáním dceřiných sporocyst a embryonálních cercárií mikroskopickými metodami v hepatopankreatu infikovaného plže. Doba po infekci byla vybrána tak, aby plži ještě nevylučovali cercárie, ale aby přitom byla snazší detekce sporocyst v závislosti na jejich počtu a velikosti. Dalším důvodem byla i optimální velikost plžů pro manipulaci a odběr dostatečného

množství hemolymfy. **Skupina C** (10 plžů) sloužila jako negativní kontrola a zahrnovala neinfikované plže. U této skupiny byla také provedena pitva s následným mikroskopováním pro potvrzení, že se jedná o nenakažené jedince. **Skupina D** (5 plžů) zahrnovala plže, kteří sice byli vystaveni přítomnosti miracidíí, ale mikroskopicky u nich nebyla nákaza prokázána.

Odběr hemolymfy byl proveden i u 10 plžů druhu *L. stagnalis* a to u 5 nakažených motolicí *T. szidati* (120 dpi) a u 5 nenakažených. Nebyla prováděna žádná mikroskopická vyšetření, protože se jednalo o kontrolní skupinu k plžům druhu *R. lagotis* – ověření, že je tato metoda použitelná i pro jiné zástupce rodu *Trichobilharzia* a jejich meziphostitele.

Pro odběr hemolymfy byla použita neinvazivní metoda a nedošlo tak k usmrcení plže. Nejprve byl plž opláchnutý vodou kvůli očištění a následně vysušen papírovým ubrouskem. Poté se plž lehce podráždil na noze zastříženou 200 µl špičkou, dokud nezačal vylučovat hemolymfu svým hemálními póry. Hemolymfa byla následně odsáta a přenesena do 1,5 ml mikrozkušavky. Kvůli zvýšení objemu a následnému přečištění vzorku byla u plžů druhu *R. lagotis* k hemolymfě přidána destilovaná voda do celkového objemu 120 µl a směs byla následně krátce a jemně promíchána. Tato optimalizace nebyla nutná u plžů druhu *L. stagnalis*, z důvodu dostatečného objemu odebrané hemolymfy zapříčiněnou větší velikostí plže. Vzorky hemolymfy byly následně vloženy na 1 h do ledu, kvůli podchlazení živých organismů (komezálkové, cercárie). Poté byl vzorek stočen ve vychlazené centrifuzě na 0 °C při 2500 x g po dobu 10 min. Na dně byl poté pozorovatelný sediment (exkrementy, komezálkové, případné cercárie), proto bylo odebráno pouze 100 µl z vrchní části vzorku do nové 1,5 ml mikrozkušavky, která byla dále použita na izolaci DNA.

4.4.5 Separace krevního séra

Z krve všech hostitelů (kachen, myši i lidí) bylo separováno sérum stejným způsobem. Nejprve se odebraná krev nechala odstát při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny, aby došlo k jejímu vysrážení. Poté byla centrifugována po dobu 15 min při 1500 x g. Po centrifugaci byl pipetou odebrán supernatant (krevní sérum), který byl přenesen do nové mikrozkušavky a opět po dobu 15 min při 1500 x g stočen. Následně bylo odebráno čisté krevní sérum do nové mikrozkušavky a uloženo při -20 °C do dalšího zpracování.

4.5 Molekulární analýza

4.5.1 Izolace DNA

Vzorky pro izolaci DNA byly převážně čerstvé, nezamražené, z důvodu zachování maximální koncentrace DNA, při opětovném zamrazování a rozmrazování vzorků dochází k degradaci.

- **Vzorky krevního séra**

Izolace DNA z krevního séra byla provedena podle protokolu pro izolaci DNA ze tkání komerčně dostupným kitem (Exgene™ Tissue SV (plus!), GeneAll®), některé kroky byly optimalizovány. Celkový čas lýze byl zkrácen na 15 min a eluce byla uskutečněna pouze 100 µl elučního pufru, kvůli docílení vyšší koncentrace parazitární DNA v eluátu. Z důvodu omezené kapacity kolony mohlo být pro izolaci DNA použito maximálně 100 µl krevního séra. Pro izolaci DNA byly dle možností použity různé objemy krevního séra (100 µl u kachen, 50 µl u lidí, 30 µl u myší).

- **Vzorky hemolymfy**

Při izolaci DNA se u vzorků hemolymfy postupovalo stejným způsobem jako v případě vzorků krevního séra (viz výše).

- **Vzorky nervové tkáně**

Vzorky s homogenizovanou nervovou tkání byly centrifugovány při 6000 x g, aby mohl být pipetou odebrán ethanol, ve kterém byly fixovány. Následně se vzorky nechaly několik minut odstát, kvůli odpaření zbytků ethanolu, které by mohly inhibovat následnou lýzi. Samotná izolace DNA probíhala podle protokolu pro izolaci DNA ze tkání komerčně dostupným kitem (Exgene™ Tissue SV (plus!), GeneAll®). Doba lýze byla stanovena na 3 hodiny, vzorky byly průběžně vortexovány. Veškeré centrifugování vzorků bylo prováděno při vyšších otáčkách z důvodů zacpávání membrány v kolonce lipidy obsaženými ve vysokém množství v nervové tkáni. Eluce byla prováděna 100 µl elučního pufru. Vstupní hmotnost zpracovávané nervové tkáně nikdy nepřesahovala kitem deklarovanou maximální hmotnost vstupního materiálu (25 mg).

- **Pozitivní kontroly**

Jako pozitivní kontroly byly použity tyto biologické materiály:

- Pro primery T1323-1 a T1323-R byla použita DNA izolována z přibližně 1000 cerkárií (*T. regenti* nebo *T. szidati*) fixovaných v 96% ethanolu.

- Pro primery ITS2 RIXO a ITS2 NEWS byla použita DNA plže *R. lagotis* nebo *L. stagnalis*. DNA byla izolována ze tkáně přední části pláště, a to z důvodu zamezení kontaminace vzorku obsahem střeva.

Z obou typů biologických vzorků – cercárie a tkáň pláště plže, byla DNA izolována pomocí izolačního kitu (Exgene™ Tissue SV (plus!), GeneAll®) podle protokolu pro izolaci DNA ze tkání. Výsledná koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop®) a následně byla DNA uchována v elučním pufru při -20 °C.

4.5.2 PCR

Všechny amplifikační reakce byly prováděny v cycleru C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) v celkovém objemu 25 µl, kde se reakční směs skládala ze složek uvedených v **Tab. 6**. Pomocí konvenční PCR byly zpracovány vzorky hemolymfy plžů a dále byla tato metoda použita při optimalizaci protokolu pro Real-time PCR. Protokoly konvenční PCR byly aplikované podle použitých primerů (viz níže).

Tab. 6. Reakční směs pro konvenční PCR.

Reagencie	Objem
EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Clontech)	12,5 µl
10 µM primer forward	0,5 µl
10 µM primer reverse	0,5 µl
DNA templát	5-10 µl
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™)	Zbytek do celkového objemu 25 µl

Pro detekci parazitární DNA byly testovány tři sady primerů s DNA z cercárií *T. regenti* jako templátem (**Tab. 7**):

- Druhově specifické primery pro gen cytochrom c oxidázy 1 (cox1) mtDNA (**Obr. 6**) (Lockyer *et al.*, 2003).
- Druhově specifické primery pro oblasti ITS1; 5,8S a ITS2 rDNA (**Obr. 7**) (Dvořák *et al.*, 2002).
- Specifické primery T1323-1 a T1323-R pro rod *Trichobilharzia*, které navrhli Hertel *et al.* (2002) pro tandemově repetitivní sekvenci Sau3A (**Obr. 8**), protokol pro PCR byl ale optimalizován (**Tab. 8**).

Tab. 7. Použité primery pro amplifikaci parazitární DNA.

Molekulární marker	Název primeru	Sekvence	Amplikon
Cox1	Cox1_schist_5'	5'-TCTTTTRGATCATAAGCG-3'	1100 bp
	Cox1_schist_3'	5'-TAATGCATMGGAAAAAACA-3'	
ITS	Its5Trem	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	1914 bp
	Its4Trem	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
Sau3A repetitivní sekvence	T1323-1	5'-GTGACTTGCTACAGGTTGG-3'	200 bp
	T1323-R	5'-GGCAAGCTCGTATACCATTC-3'	

Obr. 6. Sekvence genu *cox1* mtDNA druhů *T. regenti* (AY157190) a *T. szidati* (AY157191) s vyznačenými sekvencemi primerů (zeleně: forward Cox1_schist_5' a žlutě: reverse Cox1_schist_3').

T. regenti 5' GGTGGTTTTATTGGTTAGGTTTAAAGTTTGTTGATTCGTTTGAAATTTTGTGAGCCTTACT
T. szidati GGGGGCTTTATAGGTTTGGGTTTGAAGTTTATTAATTCGTTTAAAATTTTGTGAGCCTTACT
T. regenti ATAATTTGGTTCCTTCAGAGATTTATAATTATTTGATTACTAATCATGGTATTGCCATGAT
T. szidati ATAATTTGGTTCCTTCGAGATTTATAATTATTTGATTACTAATCATGGTATTGCTATGAT
T. regenti ATTCTTTTTTTTTAATGCCAGTATTGATTGGGGGGTTGGTAATTATCTTTTACCCTTTTTTG
T. szidati ATTCTTTTTTTTTAATGCCTGTTTTAATTGGTGGGTTGGTAATTATCTTTTGCCTTTCCTTG
T. regenti TTGGGGTTGGACGATTTGGCTTTGCCGCGTTTAAATTCCTTGAGGGTGTGGTTAATGGTTC
T. szidati TTGGGGTTAGATGATTTAGCGTTGCCCTCGTTTAAATTCCTTGAGTGTGGTTAATGGTTC
T. regenti CTTCAATGTTTTATATGGAGTTGAGTTTAGTATATGGTGCTGGTGTGGGTGGACTTTTTTA
T. szidati CTTCAATGTTTTATATGGAATTGAGTTTGAATTTATGGTGCTGGGTTGGTTGAACTTTTTA
T. regenti TCCACCTTTATCTATTCAGAGTTCGATGGGGGTTGGGGTTGATTATTTAATGTTTTCTTTG
T. szidati TCCTCCATTATCTATACAAAATCGATGGGGGTTGGGTGTTGATTATTTGATGTTTTCTTTA
T. regenti CATTGGCGGGTGTTCCTAGTCTGTTGGGTTCTGTAAATTTATAACTACTATTTTGTGTA
T. szidati CATTGGCAGGGGTTCTAGGTTGTTGGGTTCTGTAAATTTATAACTACGATTTTGTGTA
T. regenti ATCTTAGTTTTCTGTTTTCGGTTATAGTTTGGTCTTATTTATTTACTTCTATTTTGTGTGTT
T. szidati ATCTTAGCTCTCGGTTTTCGGTTGTTGTTTGGGCGTATTTGTTTACGCTATTTTACTGTT
T. regenti GCTGCTTTTACCTGTTTTGGCGGCTGGGATAACTATGTTGTTGTTGATCGGAAATTTGGT
T. szidati GTTGTCTTTACCTGCTTGGCTGCTGGTATAACAATGTTGTTGTTGATCGGAAATTTGGT
T. regenti ACTGCTTTTTTTGAGCCTTGTGGGGGGGGTGATCCTATATTATTTTACGATTTGTTTGGT
T. szidati ACTGCTTTTTTTGAACCTTGTGGGGGGGGTGATCCTATATTGTTTACGATTTATTTTGGT
T. regenti TTTTGGTTCATCCTGAAGTATACGTGTTGATTTTGCCGGGGTTGGGGTAGTGAGTCATAT
T. szidati TTTTGGTTCATCCTGAAGTATATGTATTAATTTTACCGGGATTGGGTATTGTTAGTCATAT
T. regenti TTGTATGAATCTTAGTAATAAAGACTCTTCATTTGGTTATTATGGTTTAGTTTGTGCTATG
T. szidati TTGTATGAATTTAAGTAAAAAAGATTCTTCTTTGGATATTACGGTTTAGTTTGCCTATG
T. regenti GGTTCTATAGTCTGTTTGGGTAGTGTAGTGTGGGCCACCATATGTTTATGGTGGGTTTGG
T. szidati GGTTCTATAGTGTGTTTGGGTAGTGTAGTGTGAGCTCATCATATGTTTATGGTGGGTTTGG
T. regenti ATGTTAAGACTGCTGTATTCTTTAGTTCCGGTGACTATGGTTATAGGTATTCGACGGGTAT
T. szidati ATGTTAAGACTGCTGTTTTTTTTAGTTCTGTAACAATGGTTATAGGTATTCGACAGGTAT
T. regenti AAAGGTTTTTTCTTGGTTGTATATGTTAGGTACTAGTTATTTACGCGGAGTTGAGCCGATA
T. szidati TAAGGTTTTTTCTTGGTTGTATATGTTAGGACTAGCTACTTGGCGGGGTGTTGAGCCGATA
T. regenti GTGTTGTGGGTATTAGGGTTTATTTTCTTTTACTGTAGGAGGCGTTACGGGTATAGTGT
T. szidati GTATTATGGGTTTTAGGTTTTATATTCTTTTACTGTGGGGGGGTAACAGGAATAGTTT
T. regenti TGCTGCTCTGTTTTAGATAGTTTATTTTCATGATACTTGATTGTTGATTGCTCATTTTCA
T. szidati TGCTGCTCTGTTTTGATAGTTTATTTTCATGATACTTGATTGTTATAGCTCACTTTCA
T. regenti TTATGTTTTGTCAATTGGGGTCGTATAGTACTGTAGTGATTAGTTTGAATTTGGTGATGGCCT
T. szidati TTATGTTCTTTCTTGAAGTTCTTATAGTACTGTTGTTATTAGATTGATTGTTGGTGATGACCA
T. regenti GTTATTATAGGTTATCTCTGAATAAG 3'
T. szidati GTTATAATGGGTTATCTCTGAATAAG

Obr. 7. Sekvence oblasti ITS rDNA druhů *T. regenti* (AF263829) a *T. szidati* (AF263828) s vyznačenými sekvencemi primerů (žlutě: forward Its5Trem a zeleně: reverse Its4Trem).

```

T. regenti 5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAAGACATTCA
T. szidati  GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAAGATTCTCA

T. regenti CATGTACCCAATTGAAGCACGGATATTGTTCTGGTGTGCTGAGACATGCCAGTTGGTGTAGGTTT
T. szidati CATGTACCCAATTGAAGCACGGATATTGTTCTGGTGTGCTAAGACACGCCAGTGGGTGTTGGTT-

T. regenti CAAAGCATATAAACCCGAAAGATTAAATATGAGAGTGAAGTATACATGGTGGTATCGTTCATGA
T. szidati -----

T. regenti AACCGTAGACATGTGGCCTTGTGCTATGTGC-GATCTAAACAACCGTCGGGACGGATCATGCATG
T. szidati ---GAC-----CT---GCCTAGT-----CGACCG-----AA-

T. regenti CCCATTGAGAAGACTGAGCTGAGCAGTCAATAATAGAGATCTTGGTGGTCCATTGATAAGTGTG
T. szidati ---GACCCAAAGCCTAGA----TGCTGGT-----

T. regenti TTTGGCTTGAGCAACCATTGAGCACAAGAGTGAATACTCTTGAAGACTGGGAGGGCAGTCAA
T. szidati ---AG-----GCA-AAAAG-----AA

T. regenti TAGACGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTCGGTTCATTGATCAAGTGTGTTTGGCTTGGGCAACCAT
T. szidati TA-----

T. regenti TCAGCACAAGAGAGTGAAGTAATCTTGAAGACTAGGAGGGCAGTCAATAGATGATTGAGAGAGGT
T. szidati ---CACAG-----CTTG-----

T. regenti GTTCATGTCGGTTCATTGATAAGTGTGTTGGCTTGGGCAACCATTGAGCACAAGAGTGAAG
T. szidati ---TGT-----ACC-----CGAAAGA-----

T. regenti TAATGTTGAAGACTGGCACGGCAGTCAATAGACGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTTGGTTCATTGA
T. szidati ---TTAAA-----TCAT-----

T. regenti TAAGTGTG-TTTGGCTTGGGCAACCATTGAGCACAAGAGTGAAGTAATCTTGAAGACTGGCA
T. szidati ---GTGTTGTTTGGCTTGGGAAACCAATCAGCACAATGAGTGAAGT-ATCATGATGGCTGTC-

T. regenti CGGCAGTCAATAGACGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTTGGTTCATTGATAAGTGTGTTTGGCTT
T. szidati ---CCAGTC-----GATCATTGATAGAG-----

T. regenti GGGCAACCATTGAGCACAAGAGTGAAGTA-ATCTTGAAGACTACAGCACGGCAGTCAATAGA
T. szidati ---AAATA-----TATGATCTT-----

T. regenti CGATTGAGAGAGGTGTTTCATGTTGGTTTGGATAAGTGTG-TTTGGCTTGGCAACCATTGAGCA
T. szidati ---GGTG-----GTGTTGTTTGGCTTGGGAAACCAACAGCA

T. regenti -----CAAAAGAGTGAATACTCTTTACGACTGGCACGGCAGTCAATGATTGAGTGAAGTGA
T. szidati TAAATGAAATGAGTGAAGTACTCATAAAGACTGG-----

T. regenti ACCGCGCAGTCAATCATTC-----AAACTGAACTTAAAGGAATTGACGGAAGG
T. szidati GCCTCGCAGTCAATCATCCCTAGTGTACTGTTGCTAAACTGAACTTAAAGGAATTGACGGA---

T. regenti CAGCAATGCATTATAATCTTTGACCGGGTACCTAGCCTGTATATGCTCTGATGGTGTCTCG
T. szidati -----ATTGTTGATCTTTGACCGGGTACCTAACCTGTATATGCTCTGATGGTGTCTCG

T. regenti TGACTTTTGTGTCAGATCTGCCAAGGGCGATGGGATAGTACGGACCTAATGGTGTGTGCAAG
T. szidati TGACTTTTGTGTCAGATCTGCCAAGGGCGATGGGACAGTACGGACCTAATGGTGTGTGCAAG

T. regenti GTTGAAGAAGGCTGTGTGCTATATGATGCGCCTC-GCCCTGATAATGTTTACTTCTTTTACA
T. szidati GTTGAAGAAGGCTGTGTGCTATATGATGCGCCTC-GCCCTGATAATGTTTACTTCTTTTACA

T. regenti CTGTTTAAGCGATCCGGTTTGGCTTGCCATTACGGGTTTGTGCTCCGCATGCACCTGGCTTTA
T. szidati CTGTTTAAGCGATCCGGTTTGGCTTGCCATTACGGGTTTGTGCTCCGCATGCACCTGGCTTTT

T. regenti AGCTGGACTGCATGTACGCTGGCTGGTAGACTTGCGCCCGGGTTCAGCCTCGAACCTTAGTT
T. szidati AGCTGGACTGCATGTACGCTGGCTGGTAGACTTGCGCCCGGGTTCAGCCTCGAACCTTAGTT

T. regenti CTATGCATCTGGGAAACCGGTGTGTAGGATTATTGGAGTACAACCTTGAAGCGGTGGATCACTCGG
T. szidati CTATGCATCTGGGAAACCAATGTGTAGGATTATTGGAGTACAACCTTGAAGCGGTGGATCACTCGG

T. regenti CTCGTGCGTCGATGAAGAGTGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAAGTGCATACTGCTTTGAAC
T. szidati CTCGTGCGTCGATGAAGAGTGCAGCCAACTGTGTGAATTAATGTGAAGTGCATACTGCTTTGAAC

T. regenti ATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCTACGGGATATCCTGTGGCCACGTCTGTCCGAGGGTCGG
T. szidati ATCGACATCTTGAACGCATATTGCGGCTACGGGATATCCTGTGGCCACGTCTGTCCGAGGGTCGG

T. regenti CTTTCCATCTATCAGATGCACCTTAAGTCTGGATTGGGCGAGTGCCTGCCGGCGTGTATACCC
T. szidati CTTTCCATCTATCAGATGCACCTTAAGTCTGGATTGGGCGAGTGCCTGCCGGCGTGTATACCC

T. regenti GTATATCAACGCGGGTTGCTGGTCAAAGGCTCCGTCCGAATTTTCCGGCCACAGCCTAGTCTGG
T. szidati GTATATCAACGCGGGTTGCTGGTCAAAGGCTCCGTCCGAATTTTCCGGCCACAGCCTAGTCTGG

T. regenti TGTAGAAGTTCTGATTGAGTCGCCACGGTGGGTTGTGCTCGAGTCGTAGCTTAATGATATACATA
T. szidati TGTAGAAGTTCTGATTGAGTCGCCACGGTGGGTTGTGCTCGAGTCGTAGCTTAATGATATACATA

T. regenti TATGTAAACGCTCGAGAGTACATGACCTATCGTGAATACAGTTACATATAAATGAACGGCTTGAT
T. szidati TATATAAACGCTCGAGAGTACATGACCTATCGTGAATACAGT-----TATAATTAACGACTTGAT

T. regenti TGGGGTCTATACATAGTCTATGGTTTAAACGAGAGTGTGTTATGCACATTATTATTTTACCCT
T. szidati TGGAGGTCTATACATAGTCTATGGTTTAAACGAGAGTGTGTTATGCACATTATCAGTTTTACCCT

T. regenti GACCTCGGATCAGATGTGAATACCGCTGAACCTTAAACATATCAATAAGCGGAGGA 3'
T. szidati GACCTCGGATCAGATGTGAATACCGCTGAACCTTAAACATATCAATAAGCGGAGGA

```


Obr. 8. Sekvence jedné repetice Sau3A repetitivní sekvence druhů *T. regenti* (AF442688) a *T. szidati* (AF442689) s vyznačenými sekvencemi primerů (žlutě: forward T1323-1 a zeleně: reverse T1323-R).

T. szidati 5' GATCAACTCGTAAACATAACTAATCCTTACAAACCAAACATAAGAAAATTATTCTGATG
T. regenti GATCAACCCGTAAACATAACTAATCCTTACAAACCAAACATAAGAAAATTATTCTGATG

T. szidati CTCGCTAGTGACTTGCTACAGGTTGGAGCTTCCTGGAGTTCTAGTGAGAAGTCGTGACCA
T. regenti CTCGCTAGTGACTTGCTACAGGTTGGAGTTTCGT-GAGTTCTAGTGAGAAGTCGTGACCA

T. szidati GTGAGGTCCAATTAGAAGTCACGTGTGTGGATGGATGTCCCACCGACGACAATAGTTGGG
T. regenti GTGAGGTCC-ATTAGATTTACAGTGTGTGGATGGATGTCCCACCGCCCAATGGTTGGG

T. szidati GTCGCGCTAAATCACGAATTGGTAGAAGTTAGAATTGAAGAGCCATTGAATCGGGTCCC
T. regenti TCG--CGCTAAATCACGAATTGGTAGAAGTTAGAATTACAGAGCCATTGAA-CGGGTTCC

T. szidati AGTGGCTGAATGGTATACGAGCTTGCCTTGTAAACCGGAAGGTCCTGGGTTTGAATCCAG
T. regenti AGTGGCTGAATGGTATACGAGCTTGCCTTGTAAACCGGAAGG-CCTGGGTTTGAATCCAG

T. szidati TGGGTGCGTACTTCCGATGATTCGCAAACTAGGATGAAACAGCAGCTGTCCAGTACTCCC
T. regenti TGGGTGCGTACTTCCGATGATTCGCAAACTA-GATGAAACAGCAGCTGTCCAGTACTCCC

T. szidati TGGTTTTCAATGGTTCTCTAACTGATATCAGTCCGT 3'
T. regenti TGGTTTTCAATGGTTCTCTAATGATATCAATCCGT-

Pro všechny sady primerů byl pomocí konvenční PCR stanoven detekční limit za použití genomové DNA z cercárií druhu *T. regenti*. Koncentrační řada byla vytvořena desítkovým ředěním vzorku o koncentraci 10 ng až po vzorek s koncentrací 1 fg DNA. Jednotlivé PCR byly provedeny dle protokolů popsanych v **Tab. 8**.

Tab. 8. Podmínky konvenční PCR pro použité primery.

Cox1			ITS			Sau3A		
Teplota	Čas		Teplota	Čas		Teplota	Čas	
95 °C	8 min	30x	95 °C	5 min	35x	95 °C	4 min	36x
95 °C	2 min		95 °C	30 s		95 °C	1 min	
57 °C	30 s		55 °C	1 min		57 °C	30 s	
68 °C	30 s		72 °C	1 min		72 °C	1 min	
68 °C	7 min		72 °C	10 min		72 °C	10 min	

Pro determinaci plže (*R. lagotis*, *L. stagnalis*) byly použity primery ITS2 RIXO a ITS2 NEWS (Tab. 9), které kódují region ITS2 jaderné rDNA (Almeyda-artigas *et al.*, 2000). Tyto primery byly vybrány na základě studie Huňové *et al.* (2012). Pro PCR s primery T1323-1 a T1323-R; a primery ITS2 RIXO a ITS2 NEWS byl pro docílení nižších nákladů optimalizován společný protokol (Tab. 10).

Tab. 9. Použité primery pro amplifikaci mezihostitelské DNA.

Název primeru	Sekvence	Amplikon
ITS2 RIXO	5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3'	506 bp - <i>R. lagotis</i>
ITS2 NEWS	5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3'	587 bp - <i>L. stagnalis</i>

Tab. 10. Podmínky PCR s primery ITS2 RIXO a ITS2 NEWS a primery T1323-1 a T1323-R.

Teplota	Čas	
94 °C	10 min	
94 °C	30 s	30x
50 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

4.5.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla prováděna na 2% agarózovém gelu s přidáním SYBR™ Green I (Invitrogen™). Na elektroforézu bylo použito 15 µl od každého vzorku (PCR produktu) s použitím markeru GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific™). Napětí použité pro gelovou elektroforézu činilo 100–120 V podle velikosti gelu a použité vaničky, a to v závislosti na počtu vzorků. Vyhodnocování a fotografování vzorků probíhalo pod UV lampou. U vzorků s pozitivním signálem byly při počátečních experimentech jednotlivé produkty o daných velikostech vyřezány pomocí sterilního skalpelu pod modrým světlem. Produkty byly dále purifikovány pomocí komerčně dostupného kitu Expin™ Combo GP (GeneAll®) za použití protokolu pro extrakci z gelu.

4.5.4 Příprava vzorků na sekvenaci

Vzorky na sekvenaci byly připraveny do celkového objemu 8 μ l. Purifikovaná DNA byla naředěna do 7 μ l destilovanou vodou (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™)) na výslednou koncentraci 5ng/100 bp PCR produktu. Ke vzorku byl následně přidán 1 μ l 10 μ M primeru a takto připravený vzorek byl odeslán do sekvenační laboratoře PřF UK v Praze.

4.5.5 Analýza výsledků sekvenace

Pro každý vzorek byla sekvenací získána 2 čtení (komplementární vlákna) a tyto sekvence byly upraveny a složeny do výsledné sekvence v programu Geneious (Biomatters). Úpravy zahrnovaly zkrácení sekvence na obou koncích o nekvalitní úseky čtení a dále byly opraveny případné chyby uvnitř sekvence dle komplementárního vlákna. Výsledná sekvence byla porovnána s databází NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pro determinaci druhu pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

4.5.6 Real-time PCR

Všechny reakce o celkovém objemu 14,5 μ l (**Tab.11**) probíhaly v přístroji iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) dle optimalizovaného protokolu (**Tab. 12**). Pomocí této metody byly zpracovány vzorky sér kachen, myší, lidí a dále pak vzorky nervové tkáně myší. Při qPCR byly opět použity primery specifické pro tandemově repetitivní sekvenci Sau3A ptačích motolic rodu *Trichobilharzia* (T1323-1 a T1323-R).

Tab. 11. Reakční směs pro Real-time PCR.

Reagencie	Objem
iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)	6,25 μ l
10 μ M primer forward	0,5 μ l
10 μ M primer reverse	0,5 μ l
DNA templát	5 μ l
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen™)	2,25 μ l

Před zahájením zpracování neznámých vzorků byla nejprve stanovena standardní křivka pro každý druh ptačí schistosomy zvlášť, pomocí 8 připravených standardů o určité koncentraci (10 ng – 1 fg) DNA *T. regenti* nebo *T. szidati*. Koncentrace byla ověřena pouze u standardu s nejvyšší koncentrací pomocí spektrofotometru ND–1000 (NanoDrop®), z důvodu omezené

přesnosti a citlivosti tohoto přístroje. Z tohoto standardu byly poté připraveny ostatní standardy pomocí desítkového ředění. Finální hodnoty C_q (quantitative cycle) jednotlivých standardů byly stanoveny z průměrů výsledných hodnot z několika samostatných reakcí. Za pomoci těchto hodnot byla definována funkce lineární regrese, pomocí které bylo možné vypočítat koncentraci DNA v neznámém vzorku po dosazení hodnoty C_q do této rovnice. Následně byla z rovnice vypočtena účinnost PCR, která vyjadřuje účinnost nasedání primerů pro jednotlivý templát pomocí nástroje qPCR Efficiency Calculator (ThermoFisher Scientific).

Tab. 12. Protokol pro Real-time PCR.

Teplota	Čas	
95 °C	3 min	
95 °C	15 s	40x
57 °C	15 s	
72 °C	15 s	
72 °C	1 min	

4.5.7 Analýza výsledků Real-time PCR

Nejdříve byla provedena kontrola výsledných hodnot C_q u pozitivních a negativních (bez templátu) kontrol. Jako pozitivní kontrola zde byla používána genomová DNA z cerkárií *T. regenti* či *T. szidati* (10 ng DNA v reakci) a její výsledná hodnota C_q musela odpovídat hodnotě C_q nejvyššího standardu. V závěru byly porovnány křivky tání, zda v reakci nedošlo k amplifikaci nespecifických produktů. Z výsledků qPCR byly dále použity pouze hodnoty C_q, které byly v tabulkovém programu Excel dosazeny do rovnice standardní křivky a bylo z nich vypočteno počáteční (vstupní) množství parazitární DNA v reakci. Na základě těchto hodnot bylo pro větší přehlednost a míru informací vybráno buď grafické nebo tabulkové znázornění výsledků.

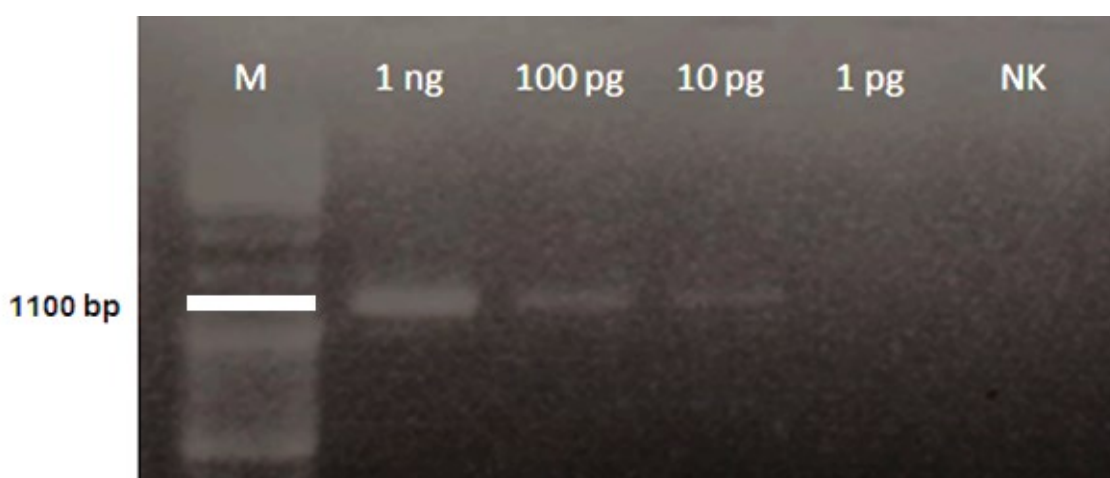
Pro každou sadu vzorků (biologický materiál, hostitelský druh, parazit) byla také stanovena hranice (threshold) mezi pozitivními a negativními výsledky. Tento threshold byl definován odečtením dvojnásobku směrodatné odchylky od průměru hodnot C_q všech negativních biologických vzorků (biologické vzorky bez parazitární DNA). V námi stanovené oblasti se tak při předpokladu normálního rozložení nachází 97,7 % negativních vzorků, proto byly všechny vzorky nacházející se v této oblasti považovány za negativní.

5 Výsledky

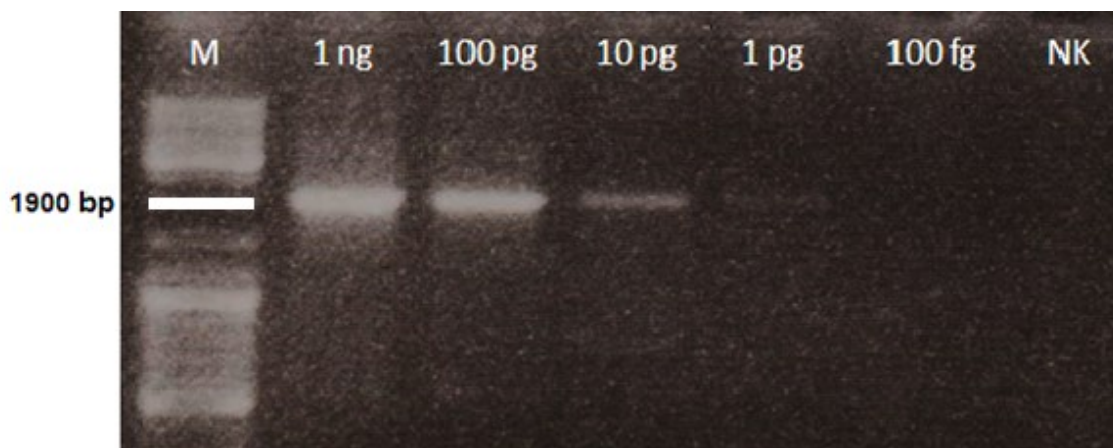
5.1 Testování detekčního limitu primerů

Pomocí konvenční PCR byl testován detekční limit u 3 sad primerů. Jako templát sloužila genomová DNA izolovaná z cerkárií *T. regenti*. S využitím zvolených primerů pro amplifikaci sekvence *cox1* mtDNA byl stanoven detekční limit 10 pg DNA (**Obr. 9**) a s primery pro oblast ITS rDNA 1 pg DNA (**Obr. 10**).

Obr. 9. Stanovení detekčního limitu pro oblast *cox1* s použitím genomové DNA *T. regenti* jako templátu. M: marker; NK: negativní kontrola.

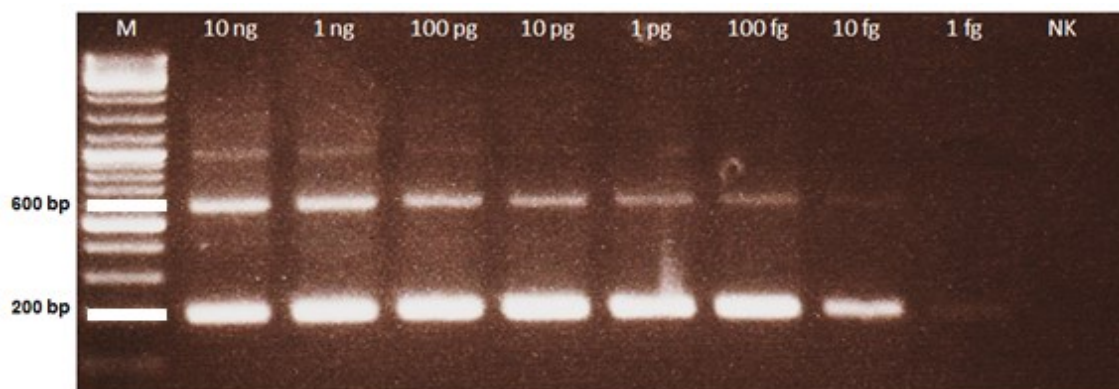


Obr. 10. Stanovení detekčního limitu pro oblast ITS s použitím genomové DNA *T. regenti* jako templátu. M: marker; NK: negativní kontrola.

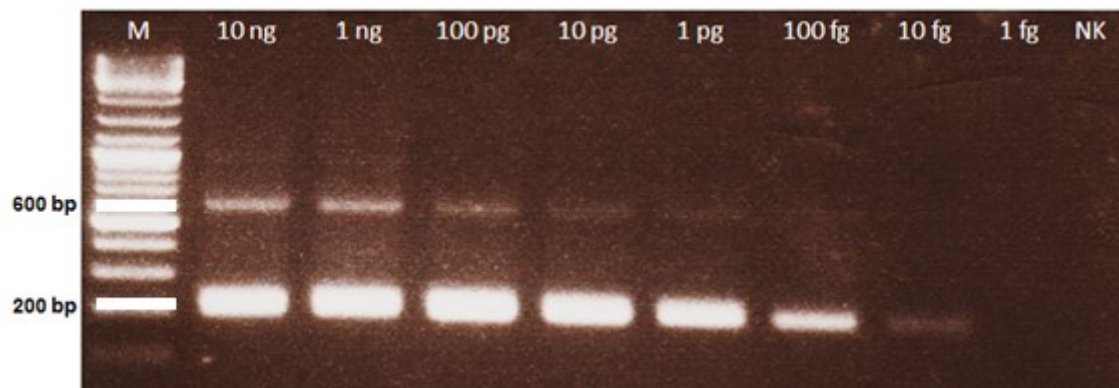


Detekce nejnižší koncentrace genomové DNA *T. regenti* však byla zaznamenána pomocí primerů T1323 pro tandemově repetitivní sekvenci Sau3A, která činila 1 fg (**Obr. 11**). Z důvodu velmi nízkého detekčního limitu byly tyto primery testovány i pro druh *T. szidati*, kde byl tento limit stanoven na 10 fg genomové DNA (**Obr. 12**). Právě kvůli svému detekčnímu limitu byly dále používány pouze tyto primery i na úkor jejich specifity (pouze rodová) oproti ostatním testovaným molekulárním markerům. Jelikož se jedná o tandemově repetitivní sekvenci, jsou na gelu patrné i produkty větších velikostí (okolo 600 bp a 1000 bp), způsobené nasednutím primeru na následující repetici čímž došlo k amplifikaci delšího úseku, tzn. že produktem je cílený 200 bp amplicon prodloužený o jeden celý úsek repetitivní sekvence (např. 396 bp u *T. szidati*). Množství těchto produktů lze redukovat pomocí snížení času pro syntézu DNA (extension time) v protokolu pro PCR, jak bylo testováno.

Obr. 11. Stanovení detekčního limitu pro repetitivní sekvenci Sau3A s použitím genomové DNA *T. regenti* jako templátu. M: marker; NK: negativní kontrola.



Obr. 12. Stanovení detekčního limitu pro repetitivní sekvenci s použitím genomové DNA *T. szidati* jako templátu. M: marker; NK: negativní kontrola.



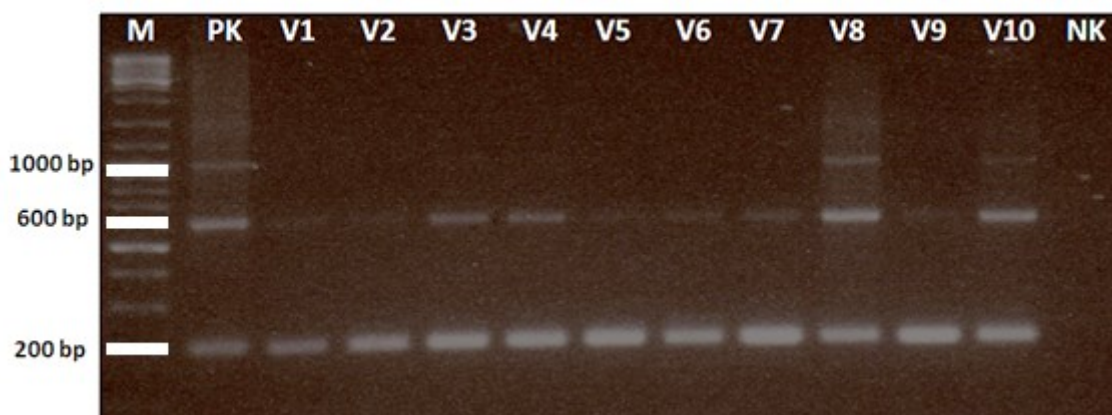
5.2 Detekce parazitární DNA v hemolymfě plžů

Pomocí konvenční PCR byly testovány vzorky hemolymfy plžů na přítomnost DNA ptačích schistosom. Jako molekulární marker sloužila tandemově repetitivní sekvence Sau3A. Diagnostika byla provedena ve dvou systémech parazit-mezihostitel (*T. regenti* - *R. lagotis* a *T. szidati* - *L. stagnalis*). Pro ověření správnosti metody byly výsledné produkty PCR vyříznuty, zpracovány a odeslány na sekvenaci a následně byla potvrzena jejich shoda s repetitivní sekvencí Sau3A *T. regenti* či *T. szidati* pomocí nástroje BLAST a porovnáním s databází NCBI.

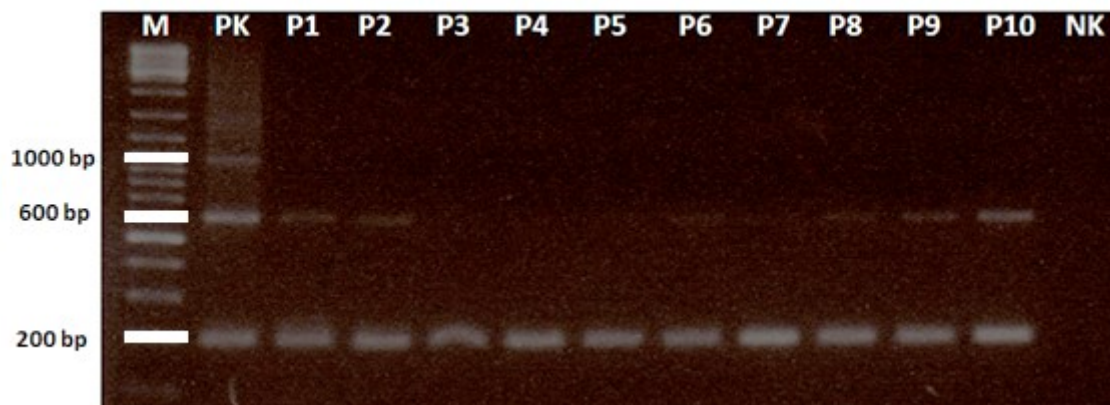
5.2.1 Detekce DNA *T. regenti* v hemolymfě *R. lagotis*

S využitím metody konvenční PCR se podařilo amplifikovat DNA *T. regenti* u všech 10 vzorků hemolymfy plžů ve skupině A, která zahrnovala plže v pozdní fázi infekce (66 dpi), kteří už vylučovali cercárie (**Obr. 13**). Parazitární DNA se také podařilo amplifikovat ve skupině B u všech 10 plžů v časně fázi infekce (36 dpi) (**Obr. 14**), kdy ještě nevylučovali cercárie, ale nákaza byla potvrzena mikroskopicky, a to přítomností dceřiných sporocyst a embryonálních cercárií (**Obr. 17 C – D**). Jeden vzorek byl také testován 29 dpi, kde byla nákaza potvrzena, jak mikroskopicky (**Obr. 17 B**), tak pomocí PCR. Žádná amplifikace nebyla pozorována u skupiny C, která zahrnovala plže neinfikované *T. regenti* a sloužila jako kontrolní skupina (**Obr. 15**). U těchto nenakažených plžů byla také provedena mikroskopická vyšetření hepatopankreatu, kde nebyla pozorována přítomnost dceřiných sporocyst či jiných vývojových stádií parazita (**Obr. 17 A**). V poslední testované skupině D byla parazitární DNA amplifikována u všech 5 plžů (**Obr. 16**), u kterých nebyla mikroskopicky pozorována přítomnost dceřiných sporocyst, ačkoliv byli vystaveni přítomnosti miracidíí.

Obr. 13. Detekce DNA *T. regenti* v hemolymfě infikovaných plžů *R. lagotis* (66 dpi) vylučujících cercárie. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; V1-V10: vzorky hemolymfy plžů.



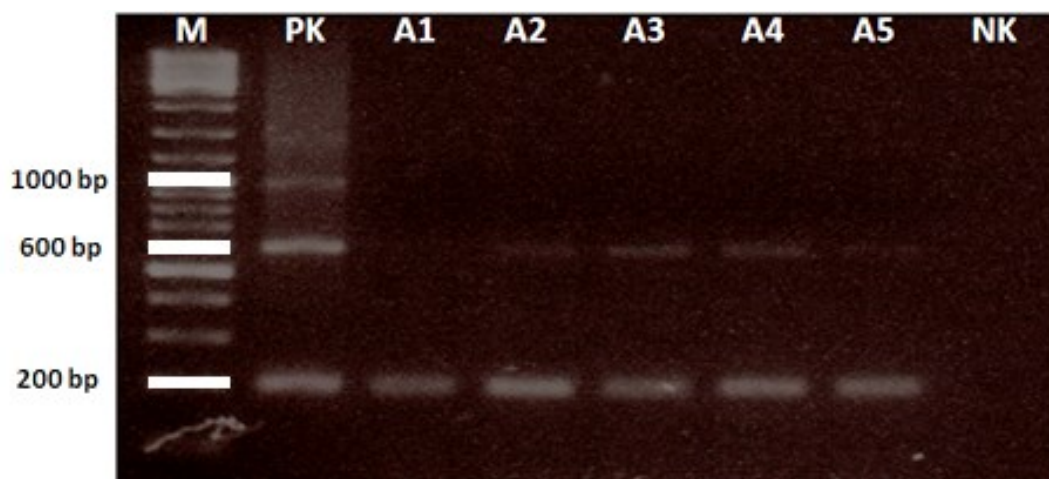
Obr. 14. Detekce DNA *T. regenti* v hemolymfě infikovaných plžů *R. lagotis* (36 dpi) v časně fázi infekce. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; P1-P10: vzorky hemolymfy infikovaných plžů.



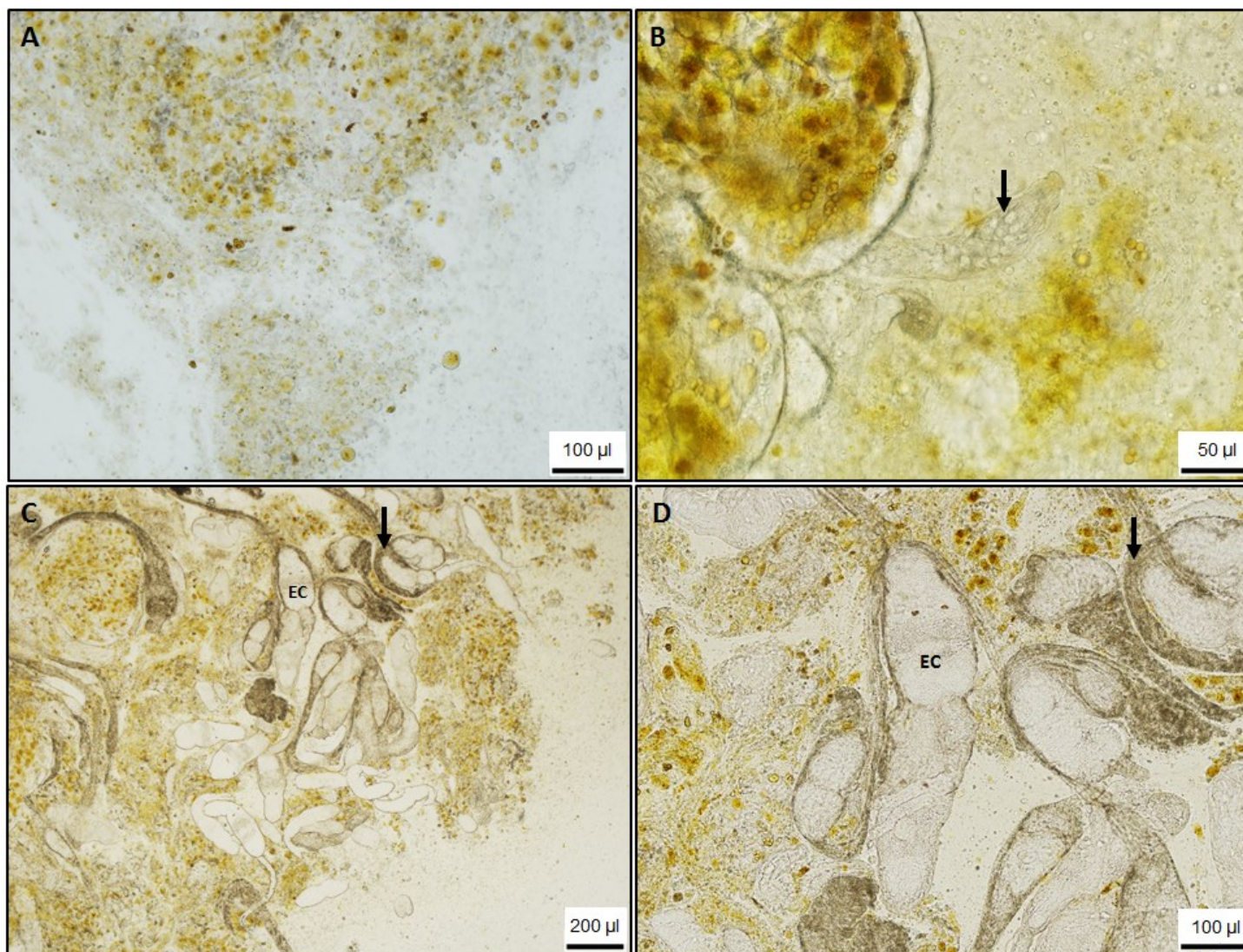
Obr. 15. Detekce DNA *T. regenti* v hemolymfě neinfikovaných plžů *R. lagotis*. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; N1-N10: vzorky hemolymfy plžů.



Obr. 16. Detekce DNA *T. regenti* v hemolymfě plžů *R. lagotis* (36 dpi) vystavených přítomnosti miracidí s negativním mikroskopickým průkazem nákazy. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; A1-A5: vzorky hemolymfy plžů.



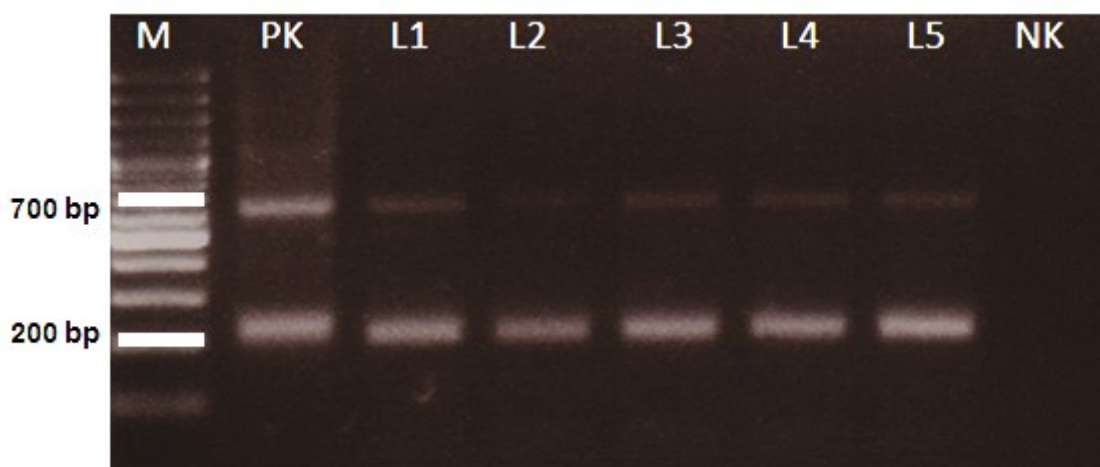
Obr. 17. Mikroskopické vyšetření roztlačového preparátu hepatopankreatu plžů (Olympus BX51). A, neinfikovaný plž; B, infikovaný plž 29 dpi; C a D infikovaný plž 36 dpi. Černá šipka: dceřiné sporocysty; EC: embryonální cercárie.



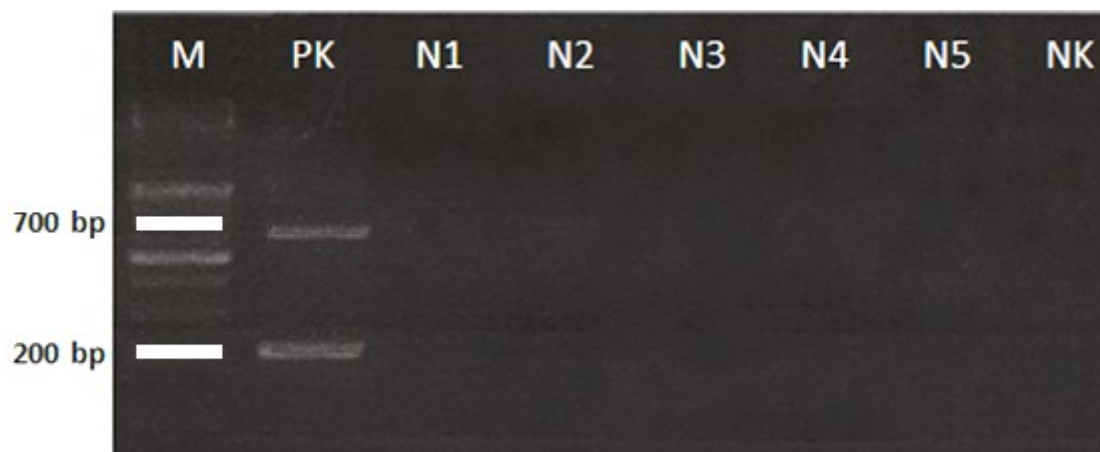
5.2.2 Detekce DNA *T. szidati* v hemolymfě *L. stagnalis*

Pro potvrzení využitelnosti metody pro diagnostiku nákazy ptačími schistosomami z hemolymfy plžů byla jako kontrola využita motolice *T. szidati* a její mezipřenositel *L. stagnalis*. Pomocí konvenční PCR se podařilo amplifikovat parazitární DNA u všech 5 infikovaných plžů *T. szidati* (120 dpi) (**Obr. 18**), kde byla jejich nákaza potvrzena vylučováním cercárií. Zároveň nebyla pozorována žádná amplifikace u plžů neinfikovaných (**Obr. 19**).

Obr. 18. Detekce DNA *T. szidati* v hemolymfě infikovaných plžů *L. stagnalis* (120 dpi) vylučujících cercárie. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; L1-L5: vzorky hemolymfy plžů.



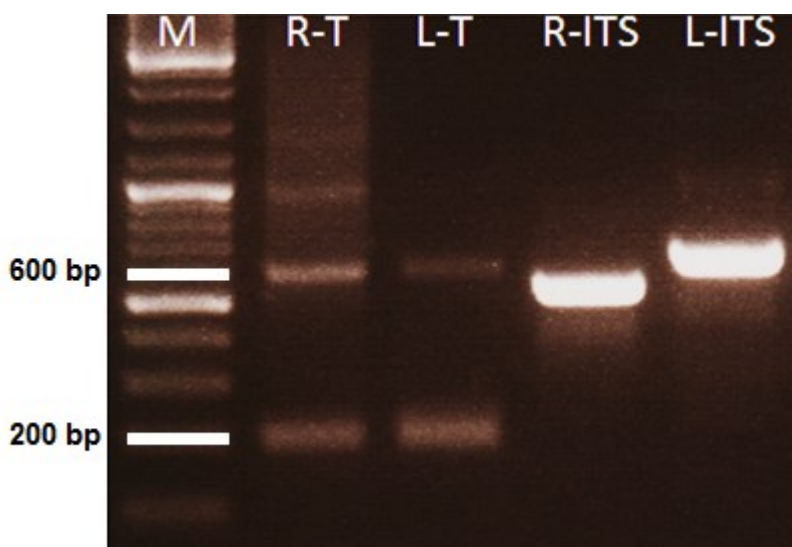
Obr. 19. Detekce DNA *T. szidati* v hemolymfě neinfikovaných plžů *L. stagnalis*. M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; N1-N5: vzorky hemolymfy plžů.



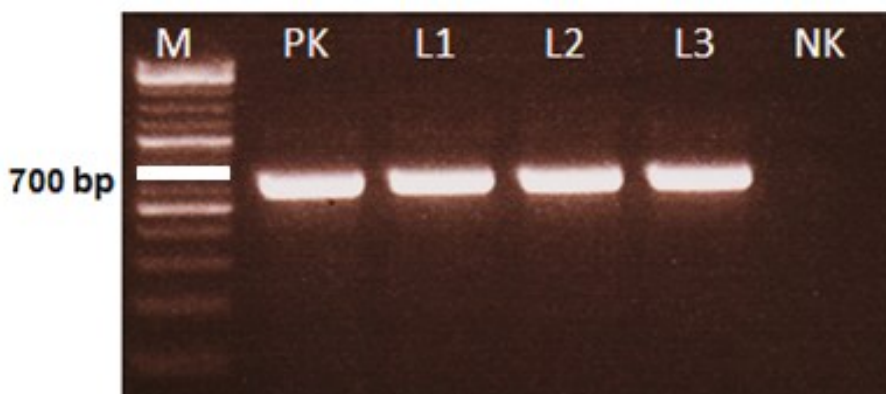
5.3 Determinace meziphostitelského plže

Vzorky hemolymfy plžů použité na detekci parazitární DNA byly zároveň využity přímo pro determinaci druhu plže (**Obr. 20**). Determinace byla prováděna na základě variability oblasti ITS2 rDNA. Ze vzorků hemolymfy plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis* bylo vybráno 5 náhodných vzorků hemolymfy pro oba druhy, zahrnujících všechny fáze infekce popsané výše. Podařilo se amplifikovat oblast ITS2 u všech vzorků, aniž by infekce ptačími schistosomami nějak ovlivnily výsledek (**Obr. 21 a 22**). Z výsledků je na první pohled patrný rozdíl ve velikosti produktů PCR mezi druhy *R. lagotis* a *L. stagnalis* (**Obr. 20**), oba amplikony byly dále zpracovány a následně osekvenovány. S využitím nástroje BLAST a srovnáním se sekvencemi v databázi NCBI byla potvrzena jejich příslušnost k jednotlivým druhům.

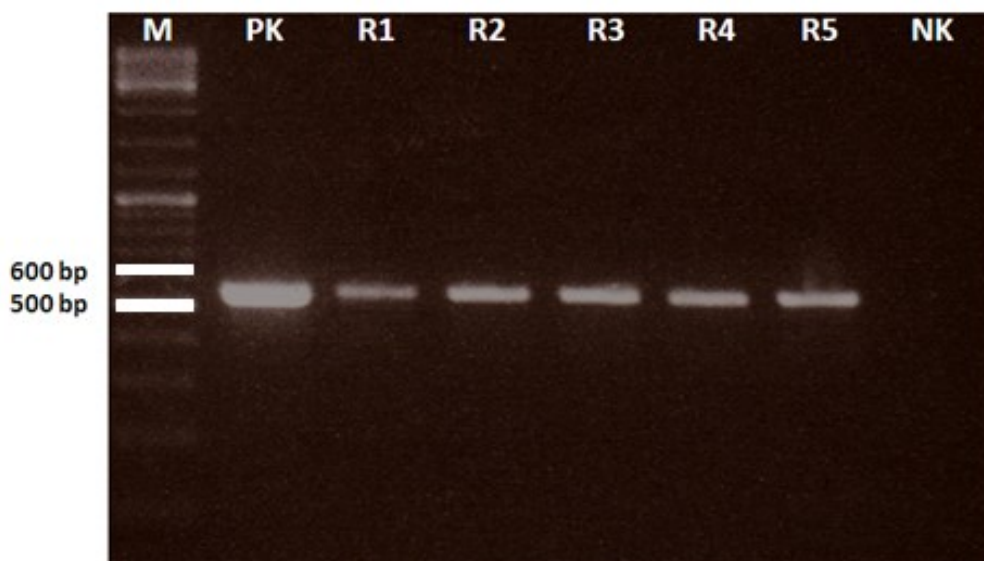
Obr. 20. Porovnání primerů pro tandemově repetitivní sekvenci a ITS2 u vzorků hemolymfy infikovaných plžů *R. lagotis* a *L. stagnalis* motolicemi *T. regenti* a *T. szidati*. M: marker; R: *R. lagotis*; L: *L. stagnalis*; T: primery T1323; ITS: primery pro oblast ITS2.



Obr. 21. Použití primerů pro oblast ITS2 k determinaci meziphostitele (*L. stagnalis*). M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; L1-L3: vzorky hemolymfy plžů.



Obr. 22. Použití primerů pro oblast ITS2 k determinaci meziphostitele (*R. lagotis*).
M: marker; PK: pozitivní kontrola; NK: negativní kontrola; R1-R5: vzorky hemolymfy plžů.



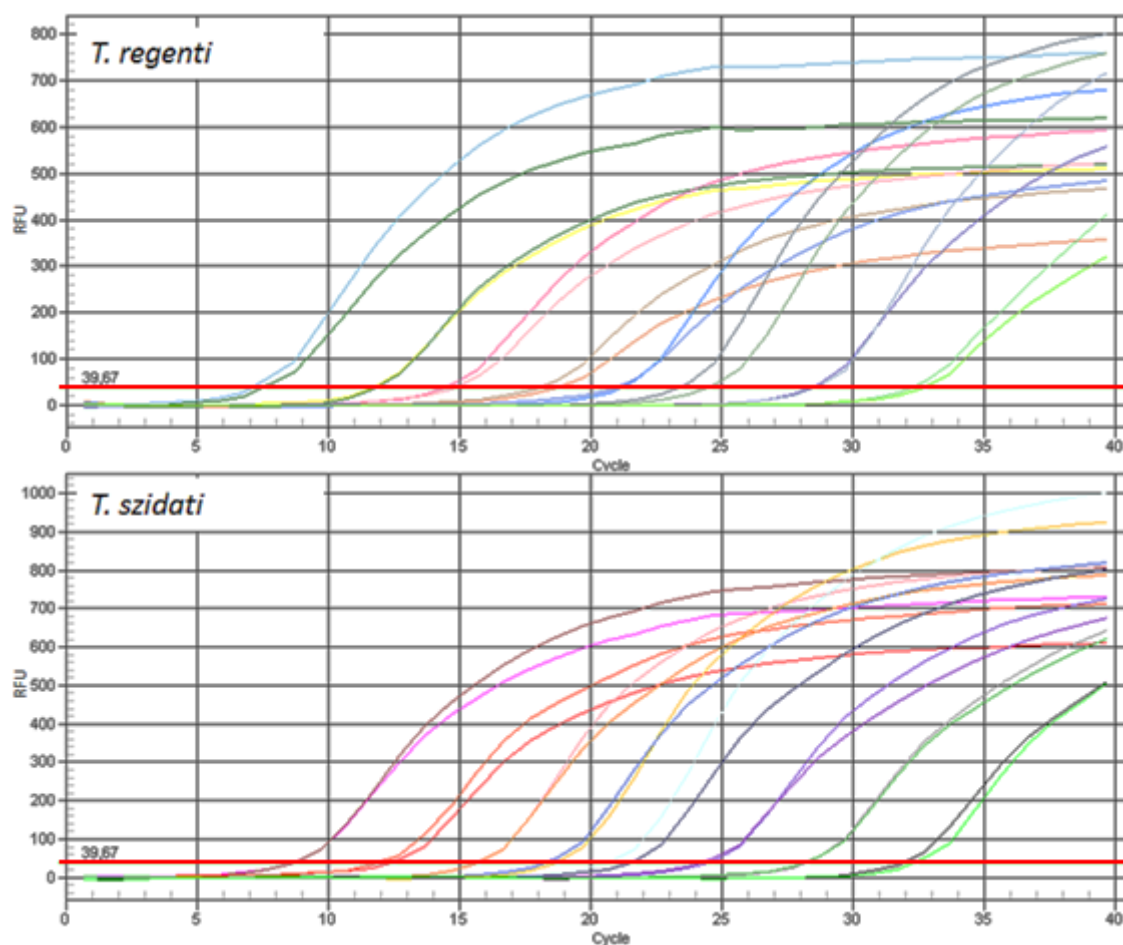
5.4 Real-time PCR

Všechny vzorky byly zpracovány v tripletech, pouze některé doplňující koncentrační řady byly výjimečně zpracovány v dubletech (**Obr. 23**). Standardní křivka (10 ng – 1 fg) byla vytvořena z templátové cercariální DNA obou druhů, *T. regenti* a *T. szidati*. Výsledné hodnoty C_q z qPCR byly ze všech samostatných reakcí zprůměrovány a tyto průměry dále sloužily jako námi používané standardní hodnoty (**Obr. 24**). Pro obě standardní křivky byla definována funkce přímky lineární regrese, interval spolehlivosti (R^2) a účinnost PCR; všechny tyto údaje jsou znázorněny v **Obr. 24**. Při porovnání teplot tání (T_m) nebyl pozorován žádný rozdíl mezi oběma druhy. V této práci je většina výsledků vyjádřena jako absolutní množství parazitární DNA v měřeném vzorku a je stanoveno, zda se tato hodnota pohybuje nad či pod experimentálně definovaným detekčním limitem. Toto množství bylo vypočteno po dosazení hodnot C_q jednotlivých vzorků do rovnice standardní křivky (**Tab. 13**).

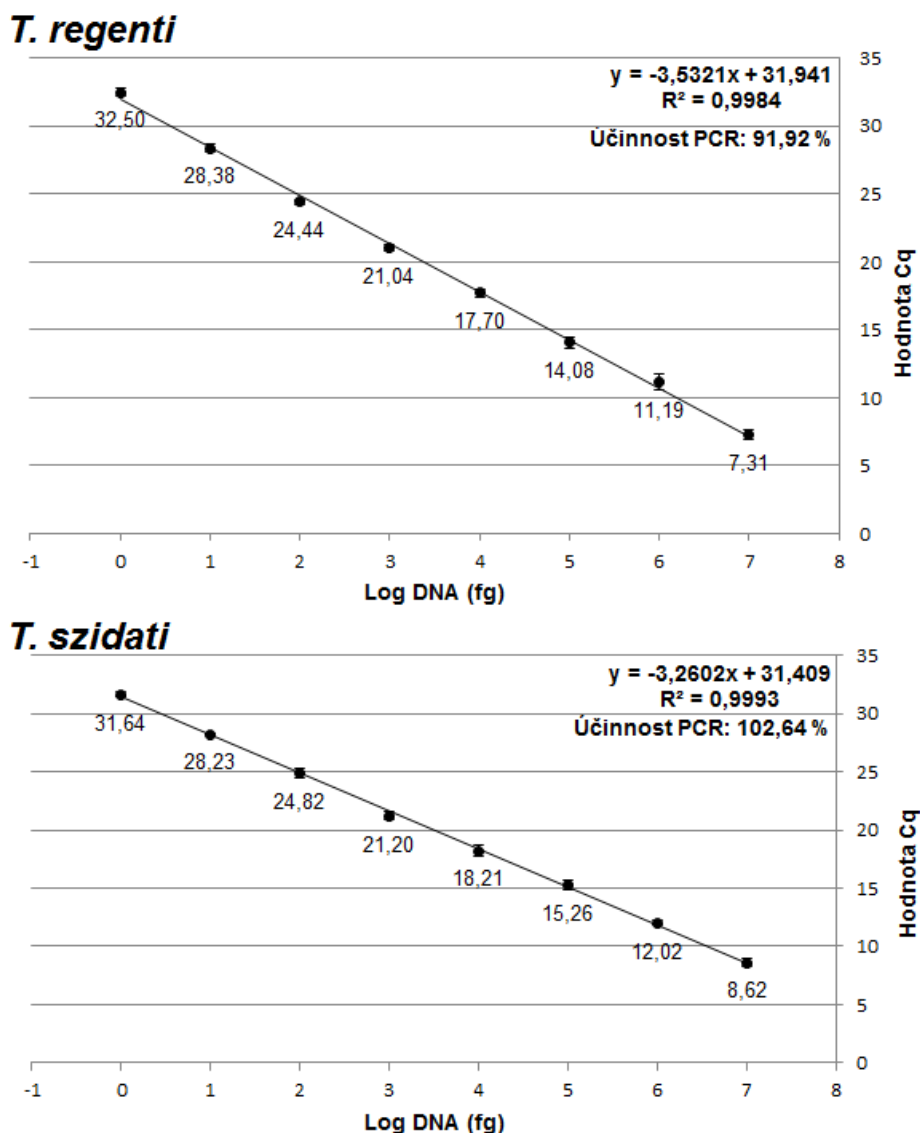
Tab. 13. Stanovené detekční limity pro jednotlivé sady vzorků

Vzorek			Hodnota C _q	Množství DNA (fg)
<i>T. regenti</i>	Kachna	Optimalizační experiment	30,02	3,50
		Vlastní experiment	30,18	3,14
	Myš	Optimalizační experiment	32,11	0,89
		Vlastní experiment	31,51	1,32
		Nervová tkáň	27,14	22,90
<i>T. szidati</i>	Kachna	Vlastní experiment	30,80	1,38
	Myš	Vlastní experiment	29,79	2,83
	Člověk	Náhodná infekce	29,79	2,83

Obr. 23. Koncentrační řada DNA *T. regenti* a *T. szidati* (10 ng – 1 fg), amplifikace metodou qPCR s použitím primerů pro oblast *Sau3A*. Červená vodorovná čára znázorňuje stanovenou hranici fluorescence pozadí.



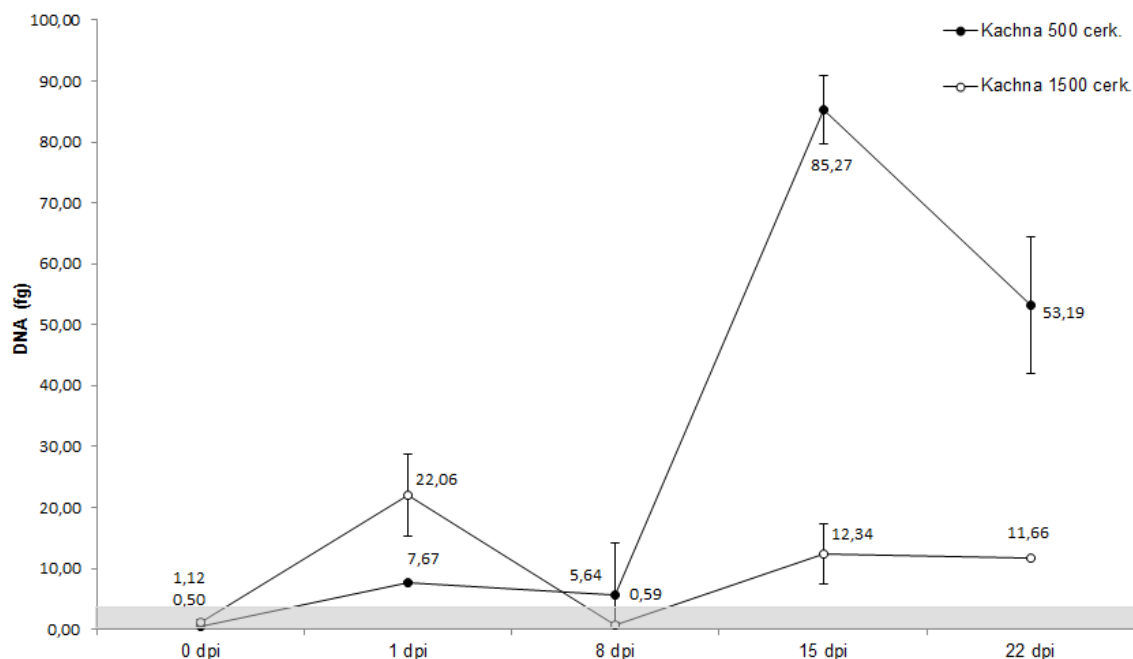
Obr. 24. Standardní křivky stanovené pro druhy *T. regenti* a *T. szidati* s primery pro oblast *Sau3A* s vyznačenými hodnotami Cq jednotlivých standardů.



5.4.1 Detekce parazitární DNA v krevním séru přirozených hostitelů

Optimalizační experimentální skupina zahrnovala 2 kachny s rozdílnou infekční dávkou (500 a 1500 cercárií *T. regenti*), oběma kachnám byla postupně odebírána krev v určených intervalech (viz výše). Parazitární DNA se podařilo amplifikovat ve většině těchto vzorků (**Obr. 25**). U vzorků sér kachny infikované 500 cercáriemi byla DNA detekována ve všech vzorcích, především pak 15 dpi a 22 dpi. U kachny infikované 1500 cercáriemi se podařilo detekovat DNA *T. regenti* u vzorků 1 dpi, 15 dpi a 22 dpi, pouze u vzorku 8 dpi bylo vstupní množství DNA pod hranici stanoveného detekčního limitu ($C_q = 30,02 \approx 3,50$ fg DNA). Oba negativní vzorky se také pohybovaly v předdefinované negativní zóně.

Obr. 25. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných kachen v průběhu infekce (Stanovený detekční limit: $C_q = 30,02 \approx 3,50$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.

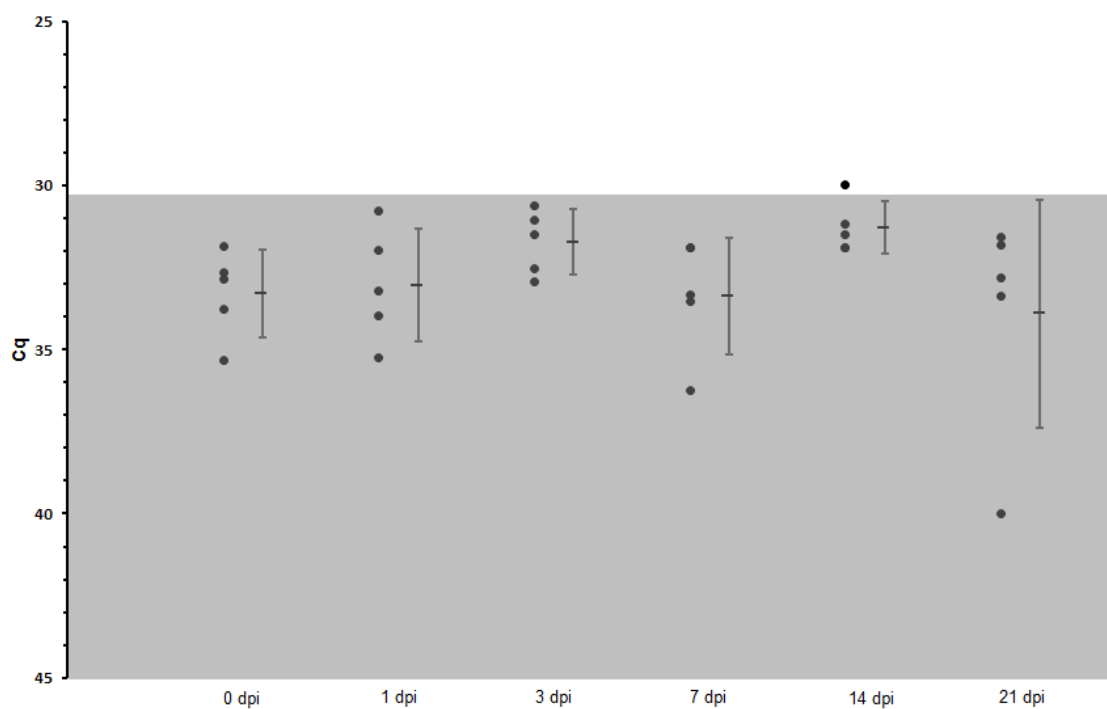


Stejných výsledků se však nepodařilo dosáhnout při vlastním experimentu, kde bylo vyšetřováno krevní sérum 5 experimentálně infikovaných kachen *T. regenti* (Tab. 14 a Obr. 26) a 4 experimentálně infikovaných kachen *T. szidati* (Tab. 15 a Obr. 27). Pouze v jediném vzorku séra kachny infikované *T. regenti* (K1-TR - 14 dpi) bylo vstupní množství DNA nad hranicí stanovené negativní zóny (*T. regenti*: $C_q = 30,18 \approx 3,14$ fg DNA; *T. szidati*: $C_q = 30,80 \approx 1,38$ fg DNA).

Tab. 14. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných kachen (Stanovený detekční limit: $C_q = 30,18 \approx 3,14$ fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

	0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
K1-TR	0,32	0,27	0,71	0,07	3,87	0,00
K2-TR	0,60	0,13	0,55	0,75	2,32	1,31
K3-TR	1,09	2,25	1,83	1,18	1,35	1,50
K4-TR	0,16	0,48	1,43	1,05	1,32	0,62
K5-TR	0,65	1,03	2,39	0,41	1,11	2,06

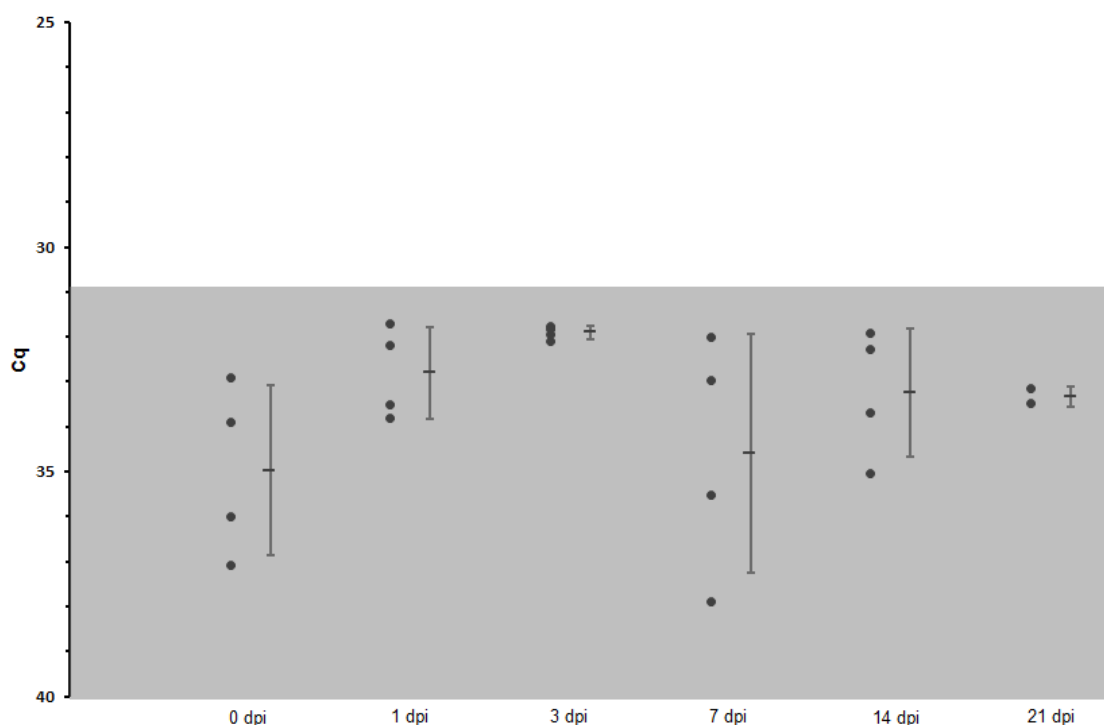
Obr. 26. Detekce DNA *T. regenti* ve vzorcích sér experimentálně infikovaných kachen (Stanovený detekční limit: $C_q = 30,18 \approx 3,14$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.



Tab. 15. Naměřené množství DNA *T. szidati* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných kachen (Stanovený detekční limit: $C_q = 30,80 \approx 1,38$ fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

	0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
K1-TS	0,40	0,52	0,55	0,01	0,18	0,66
K2-TS	0,05	0,21	0,72	0,69	0,67	0,33
K3-TS	0,17	0,17	0,91	0,06	0,61	-
K4-TS	0,09	0,72	0,66	0,29	0,08	-

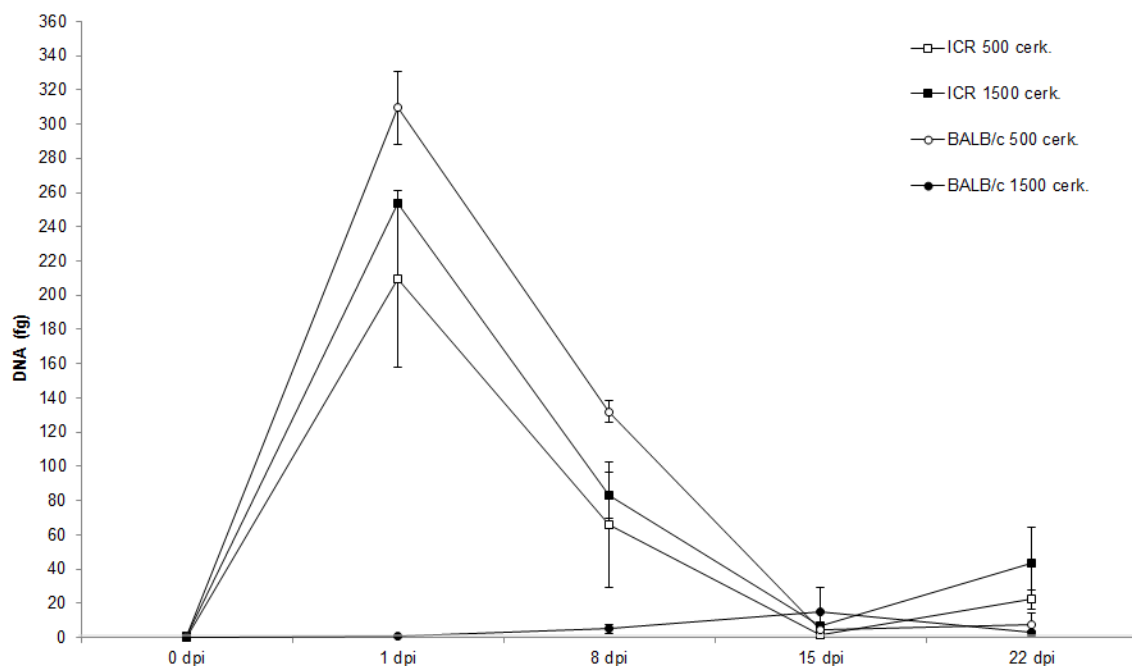
Obr. 27. Detekce DNA *T. szidati* ve vzorcích sér experimentálně infikovaných kachen (Stanovený detekční limit: $C_q = 30,80 \approx 1,38$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.



5.4.2 Detekce parazitární DNA v krevním séru náhodných hostitelů – myši

V optimalizační experimentální skupině byly zahrnuty dva kmeny myši, ICR (2 myši) infikované 500 a 1500 cercáriemi *T. regenti* a BALB/c (2 myši) infikované stejným počtem cercárií *T. regenti*. Všem myším byla postupně odebírána krev v určených intervalech. Ve všech těchto vzorcích krevního séra, s výjimkou vzorku 1 dpi z myši BALB/c infikované 1500 cercáriemi, bylo množství parazitární DNA nad hranicí stanoveného detekčního limitu ($C_q = 32,11 \approx 0,89$ fg DNA) (**Obr. 28**). Nejvíce DNA bylo kvantifikováno 1 dpi, kde vstupní množství DNA u myši BALB/c infikované 500 cercáriemi dosahovalo 309 fg. Z výsledků je patrný pokles detekovatelného množství DNA *T. regenti* v průběhu infekce, kde 15 dpi množství vstupní DNA nepřesahovalo 16 fg ani u jednoho vzorku.

Obr. 28. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných myší v průběhu infekce (Stanovený detekční limit: $C_q = 32,11 \approx 0,89$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.

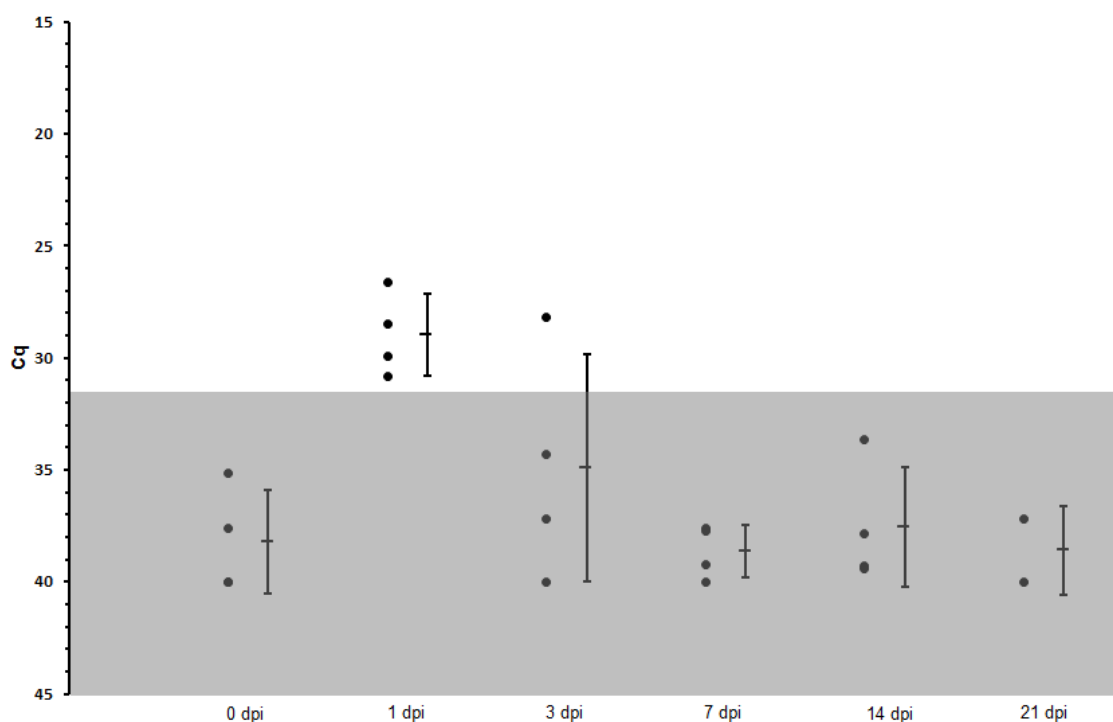


Vlastní experiment pro detekci parazitární DNA experimentálně nakažených myší *T. regenti* byl realizován odlišným způsobem než ostatní experimenty. V tomto případě nebyly prováděny postupné odběry, ale bylo použito celkem 26 myší C57BL/6, u kterých byl proveden pouze terminální odběr krve (Tab. 16 a Obr. 29). Ze vzorků krevního séra těchto myší se podařilo detekovat nadlimitní množství DNA *T. regenti* ve všech 4 vzorcích 1 dpi. Nadlimitní množství parazitární DNA bylo také detekováno v 1 vzorku 3 dpi. Množství parazitární DNA v ostatních vzorcích spadalo do námi stanovené zóny negativních vzorků ($C_q = 31,51 \approx 1,32$ fg DNA).

Tab. 16. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných myší (Stanovený detekční limit: $C_q = 31,51 \approx 1,32$ fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
0,00	2,72	0,00	0,55	0,02	1,23
0,00	2,43	1,23	0,36	0,36	0,00
0,58	31,59	0,41	0,55	0,55	-
0,91	9,51	9,25	0,02	0,02	-

Obr. 29. Detekce DNA *T. regenti* ve vzorcích sér experimentálně infikovaných myší (Stanovený detekční limit: $C_q = 31,51 \approx 1,32$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.

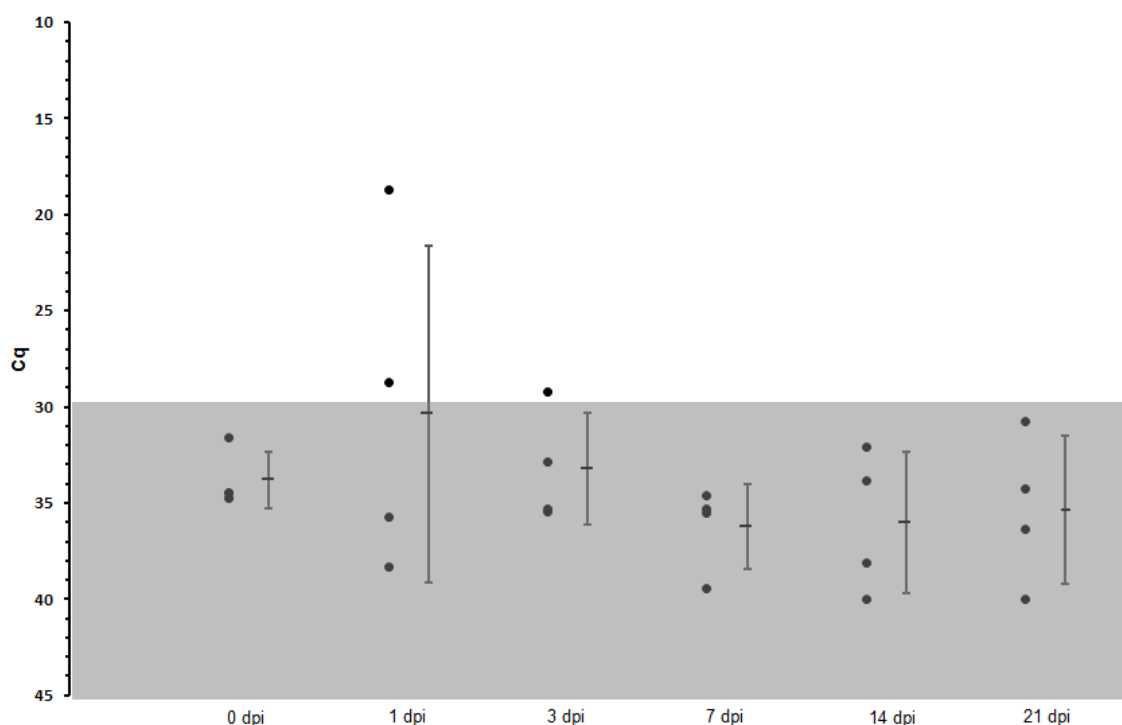


U experimentálně nakažených myší *T. szidati* byly odběry prováděny pravidelně na stejných jedincích v průběhu infekce. U těchto vzorků se podařilo detekovat nadlimitní množství parazitární DNA pouze ve 3 vzorcích (M2-TS a M4-TS 1 dpi a M4-TS 3 dpi). U vzorku M4-TS - 1 dpi bylo toto množství stanoveno na 8,65 pg DNA *T. szidati* (Tab. 17 a Obr. 30). Ostatní vzorky se nacházely pod detekčním limitem ($C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA).

Tab. 17. Naměřené množství DNA *T. szidati* (fg) ve vzorcích krevního séra experimentálně infikovaných myší (Stanovený detekční limit: $C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

	0 dpi	1 dpi	3 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
M1-TS	0,83	0,21	0,32	0,33	0,00	0,00
M2-TS	0,10	11,57	0,34	0,01	0,18	1,46
M3-TS	0,16	0,07	0,33	0,89	0,10	0,09
M4-TS	0,31	8650,16	4,37	0,26	0,55	0,88

Obr. 30. Detekce DNA *T. szidati* ve vzorcích sér experimentálně infikovaných myší (Stanovený detekční limit: $C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.



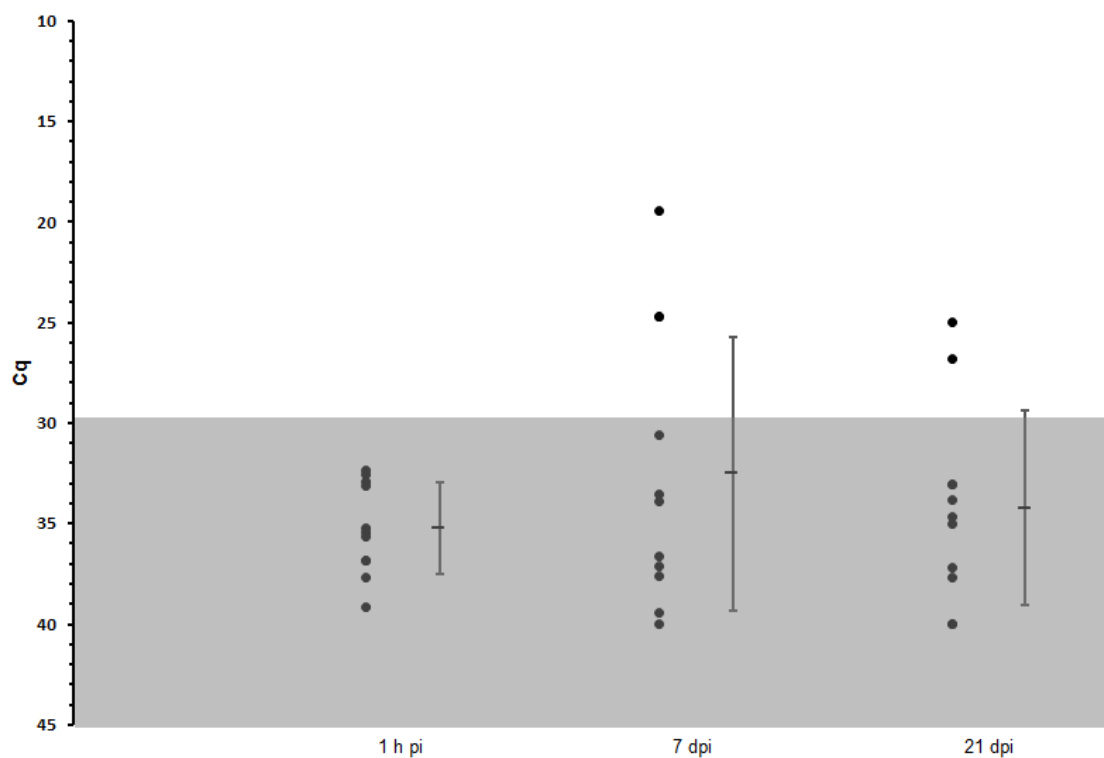
5.4.3 Detekce parazitární DNA v krevním séru náhodných hostitelů – lidí

V lidských sérech byla s využitím qPCR detekována DNA *T. szidati*. V případě tohoto experimentu byla stanovena hranice detekčního limitu na základě výsledných hodnot C_q vzorků krevního séra odebraných 1 hodinu po infekci, z důvodu absence negativních vzorků. Tyto vzorky nevykazovaly zvýšené množství parazitární cfDNA ($C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA). Celkem se podařilo detekovat nadlimitní množství parazitární DNA ve čtyřech vzorcích (**Tab. 18 a Obr. 31**), především pak u vzorku P1-TS - 7 dpi bylo toto množství obzvláště vysoké (3,88 pg). U této osoby (P1-TS) se jako u jediné podařilo detekovat parazitární DNA v obou vzorcích (7 dpi i 21 dpi). Další pozitivní vzorky byly od osob P4-TS (7 dpi) a P6-TS (21 dpi).

Tab. 18. Naměřené množství DNA *T. szidati* (fg) ve vzorcích krevního séra infikovaných lidí (Stanovený detekční limit: $C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

	1 h pi	7 dpi	21 dpi
P1-TS	0,36	3878,15	37,73
P2-TS	0,01	0,92	1,43
P3-TS	0,00	0,00	0,26
P4-TS	0,68	139,87	0,35
P5-TS	0,50	0,33	0,00
P6-TS	0,33	1,83	80,01
P7-TS	0,25	0,16	0,77
P8-TS	0,41	2,58	0,61
P9-TS	0,14	2,07	0,00
P10-TS	1,62	0,01	0,60

Obr. 31. Detekce DNA *T. szidati* ve vzorcích sér infikovaných lidí (Stanovený detekční limit: $C_q = 29,79 \approx 2,83$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.



5.4.4 Detekce parazitární DNA ve vzorcích nervové tkáně myši

Metodou qPCR byla detekována a kvantifikována DNA *T. regenti* ve vzorcích míchy a mozku experimentálně infikovaných myši C57BL/6 (**Obr. 32**). Hranice detekčního limitu byla opět stanovena z hodnot C_q negativních (neinfikovaných) myši pro mozek a míchu zvlášť, rozdíl byl však minimální, proto byla použita nižší hodnota C_q z obou těchto typů vzorků (C_q = 27,14 ≈ 22,90 fg DNA). Nadlimitní množství parazitární DNA bylo detekováno ve všech vzorcích míchy 7 dpi a 14 dpi (**Tab. 19**). V dalších dnech po infekci (21 dpi a 28 dpi) se už v některých vzorcích nepodařilo parazitární DNA detekovat. U vzorků mozku se podařilo detekovat nadlimitní množství DNA jen v několika případech, především 14 dpi a 21 dpi (**Tab. 20**).

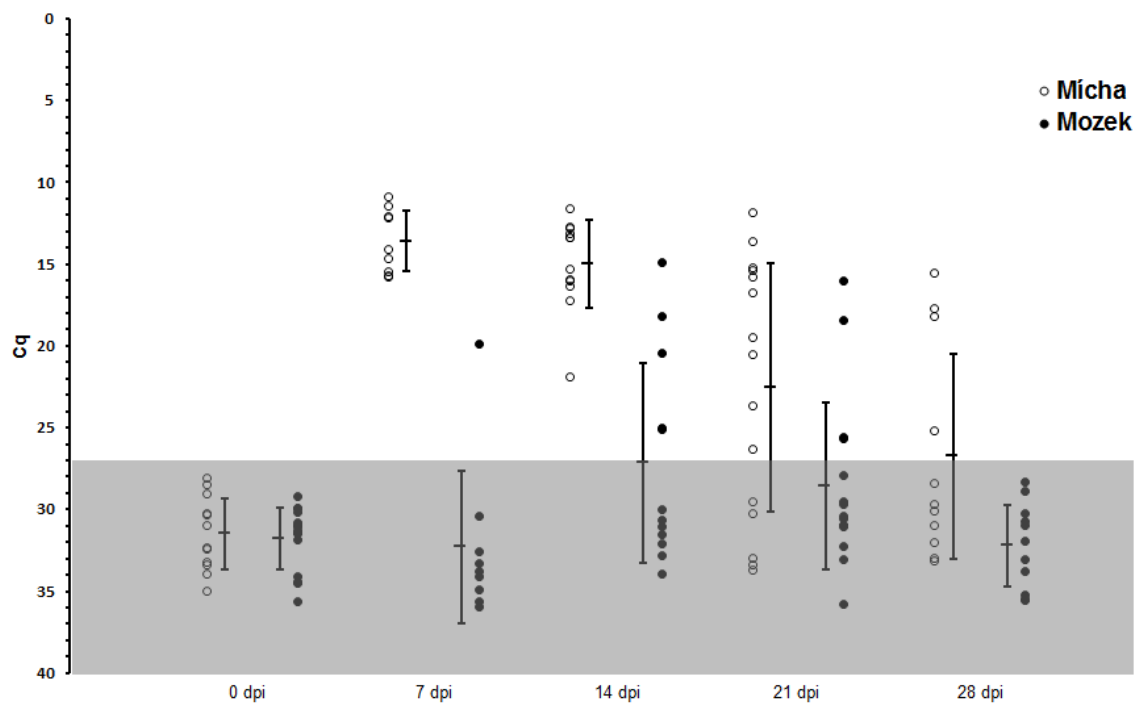
Tab. 19. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích míchy infikovaných myši (Stanovený detekční limit: C_q = 27,14 ≈ 22,90 fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
0,38	422504,81	254097,19	0,50	10484,66
0,43	46654,53	176381,87	219,62	4,28
0,72	894163,64	183417,60	39,29	3,39
0,28	113963,32	566545,27	494060,24	1,85
0,14	403657,87	276570,06	48200,30	0,94
0,76	628830,29	31143,03	1734,40	0,49
12,23	38367,06	208960,67	0,39	9,93
1,88	77575,69	25279,19	2,97	7768,20
6,46	37624,00	50122,97	4,78	82,60
3,03	-	691,76	0,32	-
2,78	-	14619,90	54201,45	-
9,67	-	33024,90	3438,93	-
-	-	-	19861,39	-
-	-	-	155833,77	-
-	-	-	37379,53	-

Tab. 20. Naměřené množství DNA *T. regenti* (fg) ve vzorcích mozku infikovaných myší (Stanovený detekční limit: Cq = 27,14 ≈ 22,90 fg DNA). Bílá: hodnoty nad hranicí detekčního limitu, Šedá: hodnoty pod hranicí detekčního limitu.

0 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi	28 dpi
2,05	0,07	1,32	0,47	2,22
3,11	0,14	7921,62	1,78	10,46
1,53	0,30	0,57	1,86	2,97
3,61	0,09	1,75	62,00	1,85
5,97	0,67	3,48	2,38	0,12
1,40	0,41	84,23	6686,57	0,48
1,86	0,24	67650,49	13,49	1,01
0,25	2615,25	91,09	4,91	0,10
1,34	2,73	1757,16	4,31	7,26
0,19	-	2,26	0,08	0,30
1,74	-	0,90	2,77	0,10
3,73	-	-	1,87	-
0,09	-	-	32174,87	-
0,19	-	-	59,63	-
1,08	-	-	0,79	-

Obr. 32. Detekce DNA *T. regenti* ve vzorcích nervové tkáně myši (Stanovený detekční limit: $Cq = 27,14 \approx 22,90$ fg DNA). Šedě vyznačena negativní zóna.



6 Diskuze

V rámci této práce bylo optimalizováno několik kroků, souvisejících s výběrem postupů vhodných pro izolaci DNA, výběrem molekulárního markeru, protokolu pro PCR a výběrem biologického materiálu; které v určitých případech nejsou podrobněji rozebrány v kapitole METODIKA a VÝSLEDKY, ale jsou současně s výsledky diskutovány až v této kapitole, především se záměrem objasnit a obhájit, proč byly učiněny jednotlivé dílčí kroky a rozhodnutí během experimentů.

6.1 Výběr molekulárních markerů

Na začátku této práce byly testovány sady primerů pro amplifikaci tří nejčastějších skupin molekulárních markerů, mtDNA (*cox1*), rDNA (ITS) a repetitivní sekvence (Sau3A), které byly přímo navrženy nebo použity pro determinaci ptačích schistosom již v předchozích studiích (Dvořák *et al.*, 2002; Hertel *et al.*, 2002; Lockyer *et al.*, 2003). Za použití všech tří sad primerů byl stanoven detekční limit metody PCR s využitím DNA z cercárií *T. regenti* jako templátové DNA. S použitím primerů pro gen *cox1* bylo dosaženo detekčního limitu metody 10 pg, s využitím primerů pro oblast ITS detekční limit metody odpovídal 1 pg DNA *T. regenti*. Oba tyto primery jsou druhově specifické a s jejich využitím by bylo možné determinovat i samotný druh, avšak v porovnání s primery pro repetitivní sekvenci Sau3A byl jejich detekční limit příliš vysoký. V této práci proto byly dále používány pouze primery pro tandemově repetitivní sekvenci Sau3A, právě kvůli jejich nízkému detekčnímu limitu, ačkoliv nejsou druhově specifické. Pro porovnání byly u lidských schistosom stanovené detekční limity pro obdobné molekulární markery např. 100 fg pro *cox1* *S. mansoni* (qPCR), 3,7 pg pro oblast ITS *S. haematobium* (konvenční PCR), 80 ag pro repetitivní sekvenci SjR2 *S. japonicum* (LAMP) a dokonce pouze 10 ag pro repetitivní sekvenci Sm1-7 *S. mansoni* (konvenční PCR) (Sandoval *et al.*, 2006; ten Hove *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2015).

Pomocí konvenční PCR byl stanoven detekční limit při použití těchto primerů na 1 fg u *T. regenti* a 10 fg u *T. szidati*, podařilo se nám tedy docílit nižšího detekčního limitu, ve srovnání s Hertelem *et al.* (2002), kteří dosáhli limitu 100 fg přidané genomové DNA do reakce pro oba námi vybrané druhy, zároveň se jim podařilo stanovit limit detekce - 1 cercárie *T. szidati* přidaná do 0,5 g planktonu. Podobných výsledků jako v našem případě dosáhla již Vaščíková (2015). Pro lepší představu a srovnání, genom jedné buňky příbuzného druhu *S. mansoni* obsahuje přibližně 580 ng DNA (Ferrer *et al.*, 2015). Tato hodnota je mnohonásobně větší, než je námi stanovený detekční limit a vyplývá z toho, že pro úspěšnou detekci parazitární DNA je teoreticky dostačující jen jediná buňka ptačí motolice. Nestejný detekční limit u *T. regenti* a *T. szidati* pak bude pravděpodobně způsoben rozdílným zastoupením repetitivní sekvence Sau3A

v genomech těchto dvou druhů ptačích schistosom, která tvoří 2 % genomu *T. regenti*; 1,5 % genomu *T. szidati* a 1 % genomu *T. franki* (Hertel *et al.*, 2002). Repetitivní sekvence, jakožto molekulární markery jsou s ohledem na vysoké zastoupení v genomech vhodné pro detekci parazitární cell-free DNA (Xu *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2015).

6.2 Detekce parazitární DNA v hemolymfě meziphostitelských plžů

Pro optimalizaci molekulárně-diagnostických metod byl vybrán parazit-meziphostitelský systém především z několika důvodů. Zaprvé je známo, že dceřiné sporocysty jsou v hepatopankreatu infikovaného plže většinou přítomny v obrovském množství (Olivier and Mao, 1949; Etges *et al.*, 1975) a pro naše účely se tak zvyšovala pravděpodobnost zachycení cell-free DNA. Dále bylo v chovech k dispozici dostatek infikovaných plžů, mohlo tedy být zpracováno mnohem více vzorků a byla tak ušetřena laboratorní zvířata z řad obratlovců (kachny a myši). Pro manipulaci s plži (jako bezobratlými) také není nutné žádné speciální osvědčení. V neposlední řadě mohl být pro odběr hemolymfy použit neinvazivní postup, při kterém nedošlo k usmrcení plže, což pro nejrozličnější typy experimentů může přinášet různé výhody.

Pomocí konvenční PCR jsme provedli řadu experimentů za účelem rozeznání nákazy *Trichobilharzia* spp. ve vzorcích hemolymfy plžů v různých fázích infekce, tj. inovativní provedení vyšetření s tím, že meziphostitel vždy odběr přežívá. Toto je zásadní rozdíl oproti diagnostice lidských schistosom, kde je často celý plž homogenizován a následně je z tohoto homogenátu izolována DNA (Jannotti-Passos *et al.*, 1997; Abbasi *et al.*, 2010; Kumagai *et al.*, 2010). Celkově je odběr hemolymfy a její následné využití jako vstupního materiálu pro izolaci DNA mnohem praktičtější, vzorky je např. možné snadněji poolovat a vyšetřit tak rychleji větší množství plžů.

Odběr hemolymfy byl tedy prováděn neinvazivně, podrážděním plže na noze, čímž došlo k vylučování hemolymfy hemálním pórem v důsledku jeho obranného mechanismu, kdy se plž snaží zatáhnout své tělo do ulity (Lever and Bekius, 1965; Joosse and Van Elk, 1986). Množství vyloučené hemolymfy závisí na velikosti plže, u *R. lagotis* se objem hemolymfy, kterou bylo možné odebrat pohyboval v rozmezí 50-100 µl, zatímco u většího druhu *L. stagnalis* objem vyloučené hemolymfy často přesahoval 200 µl. Pro naše potřeby byl dostačující vzorek o objemu 50 µl, který byl ale naředěn destilovanou vodou do objemu 120 µl pro následnou lepší manipulaci a zpracování.

Úprava vzorků hemolymfy před izolací DNA byla prováděna několika způsoby. Vzorky byly ředěny pouze u plžů *R. lagotis*, kde se podařilo odebrat pouze malé množství hemolymfy (přibližně 50 µl). Ředěním došlo k navýšení objemu a mohla tak být snáze oddělena kapalná fáze od té pevné (exkrementy, komezálkové, případné cercárie). Tento krok byl prováděn především kvůli zamezení izolace jiné DNA než samotného parazita a meziphostitelského

plže. DNA odpovídající jiným organismům by mohla negativně ovlivnit výsledky, tím že by např. nasýtila membránu izolační kolonky na úkor té námi cílené, případně by mohlo dojít k nespecifickým zkříženým reakcím, což je ale málo pravděpodobné.

Pro detekci parazitární DNA *T. regenti* bylo dohromady použito 35 vzorků hemolymfy plžů *R. lagotis* rozdělených do 4 skupin dle fáze infekce. Skupiny byly vytvořeny tak, aby zahrnovaly plže v pozdní fázi infekce (vylučující cercárie), plže v časně fázi infekce (ještě nevylučující) a nenakažené jako negativní kontrolu. Tyto 3 skupiny dohromady zahrnovali 30 plžů, u kterých bylo provedeno mikroskopické, případně vizuální (vyučování cercárií) vyšetření za účelem potvrzení nákazy *T. regenti*. Nejdříve byl proveden odběr hemolymfy, následně byl plž vypitván a byl vytvořen roztakový preparát hepatopankreatu, kde byla pozorována přítomnost či nepřítomnost dceřiných sporocyst či embryonálních cercárií. Pomocí konvenční PCR se podařilo u všech 20 infikovaných plžů amplifikovat DNA *T. regenti*, zatímco u 10 neinfikovaných plžů nebyla pozorována žádná amplifikace.

Sluiter (1981) pozoroval mateřské sporocysty *T. szidati* ve tkáních plže od 4. do 33. dne po infekci, přičemž už od 19. dne po infekci byly detekovatelné dceřiné sporocysty v hepatopankreatu. Celý vývoj *T. szidati* v plži je závislý na teplotě, proto můžou být při vyšších teplotách cercárie vylučovány už v 5. týdnu po infekci (Sluiter *et al.*, 1980; Sluiter, 1981). U *T. regenti* bylo vylučování cercárií pozorováno nejdříve 5. týden po infekci (Horák *et al.*, 1998a). U skupiny v časně fázi infekce byl proto vybrán 36. den po infekci jako optimální doba po naze. V této době byly v hepatopankreatu plže snadno pozorovatelné dceřiné sporocysty a samotný plž dosahoval optimální velikosti pro snadnou manipulaci a odebrání dostatečného množství hemolymfy. Otestována byla i detekce 29 dpi, kde se podařilo, jak mikroskopicky, tak molekulárně potvrdit naze *T. regenti*. Problém ale byl, že mikroskopické vyšetření bylo pro nezkušeného pozorovatele velice obtížné, proto bylo od tohoto období upuštěno a byli použiti plži až v pozdější fázi infekce (36 dpi). Všichni tito plži byli vystaveni přímému zdroji světla po dobu 6 hodin, aniž by byly pozorovány vyloučené cercárie a následně při mikroskopii nebyly pozorovány plně vyvinuté cercárie.

Poslední skupina 5 plžů, kteří byli vystaveni přítomnosti miracidí, ale nebyla u nich mikroskopicky potvrzená naze; byla do experimentu zahrnuta dodatečně. Zajímavostí je, že se u této skupiny také podařilo detekovat parazitární DNA ve všech 5 vzorcích hemolymfy, pravděpodobně se jednalo o cfDNA uvolněnou buď z reziduí miracidí, což je vzhledem k času odběru po infekci málo pravděpodobné; nebo spíše z reziduí mateřských či dceřiných sporocyst, které byly během infekce zahubeny imunitním systémem plže a nebylo je tak možné pozorovat pod mikroskopem; případně mohlo dojít k falešně negativnímu vyhodnocení nákazy ze strany pozorovatele. Plži disponují buněčnými a humorálními složkami obranných mechanismů, kde v boji s larválními stádii motolic mají zásadní roli převážně hemocyty. Miracidia či sporocysty jsou opsonizovány lektiny a následně enkapsulovány a cytotoxicky eliminovány

hemocyty, produkci superoxidu, peroxidu vodíku a oxidu dusnatého (Dikkeboom *et al.*, 1988; Lodes and Yoshino, 1990; van der Knaap and Loker, 1990; Loker and Adema, 1995; Sapp and Loker, 2000; Hahn *et al.*, 2001; Humphries and Yoshino, 2008). Peštová (2015) se ve své diplomové práci zabývala vývojem *T. regenti* v meziphostitelském plži, kde pozorovala mateřské sporocysty ještě 20 dpi. V tomto období po infekci se již začínaly v hepatopankreatu plže objevovat dceřiné sporocysty. Tato pozorování potvrzují naši teorii, že detekovaná parazitární DNA by mohla pocházet z reziduí těchto vývojových stádií.

Pro potvrzení funkčnosti této metody i v dalších systémech hostitel-parazit, byl vybrán plž *L. stagnalis* jako meziphostitel *T. szidati*. Zde bylo použito pouze 10 plžů, 5 nakažených (120 dpi) a 5 nenakažených. I v tomto případě se podařilo pomocí konvenční PCR detekovat parazitární DNA u všech pozitivních vzorků hemolymfy, zatímco nedošlo k žádné amplifikaci u negativních vzorků.

U vylučujících plžů byly ve vzorku hemolymfy často pozorovány cercárie (v řádu jedinců), proto mohla být DNA v těchto vzorcích jiného původu než u vzorků hemolymfy nevylučujících plžů. Z tohoto důvodu byl proveden jednoduchý experiment, kdy byl vzorek vody, obsahující malé množství cercárií *T. regenti*, zpracován stejně jako vzorek hemolymfy (zchlazení, centrifugování, odebrání horní vrstvy, izolace DNA) a pomocí konvenční DNA diagnostikován na přítomnost parazitární DNA. Výsledky byly pozitivní, v malé míře se podařilo detekovat DNA *T. regenti*. Původ této DNA může být připsán možnému poškození cercárií při odběru hemolymfy, vylučování exkrečně/sekrečních produktů nebo poškození cercárií při centrifugování, např. odtržením ocásku.

Pro determinaci *Trichobilharzia* spp. ze vzorku hemolymfy vylučujících plžů byly otestovány i výše zmíněné molekulární markery pro oblasti *cox1* a ITS (**Tab. 8**), oba vykazovaly obdobné výsledky jako primery pro repetitivní sekvenci *Sau3A*. Ze zjištěného rozdílného detekčního limitu je tedy patrné, že se v hemolymfě vylučujících plžů vyskytuje parazitární cfDNA ve vysokých koncentracích, což potvrdilo naši původní domněnku.

Dle výsledků našich experimentů by mohla být tato metoda úspěšně používána např. v terénních studiích. Výhodou je, že se jedná o neinvazivní, relativně snadnou, a především rychlou metodu např. pro mapování výskytu ptačích schistosom (případně i dalších druhů motolic). Využitím této metody by bylo možné determinovat velké množství plžů bez nutnosti jejich usmrcení, vystavování zdroji světla atd. S využitím námi používaných molekulárních markerů pro determinaci meziphostitelských plžů by mohlo také současně dojít k molekulární determinaci druhu bez nutnosti proměření morfologických parametrů. Pro shrnutí, na základě našeho výzkumu by bylo možné neinvazivně determinovat parazita a samotného meziphostitelského plže pouze ze vzorku odebrané hemolymfy.

6.3 Optimalizace pro Real-time PCR

Stanovené standardní křivky s primery pro repetitivní sekvenci Sau3A splňovaly důležitá kritéria pro jejich použití v praxi (interval spolehlivosti >99 %, účinnost PCR v rozmezí 90 a 110 %) (Ferre, 1992; Pfaffl, 2001; Larionov *et al.*, 2005) a současně vykazovaly pouze nízké rozdíly mezi oběma druhy ptačích schistosom. Hodnoty C_q odpovídající jednotlivým koncentracím genomové DNA byly u *T. szidati* vyšší v porovnání s *T. regenti* (přibližně o 1,3 cyklu), což bude pravděpodobně zapříčiněno nižším zastoupením této repetitivní sekvence v genomu oproti *T. regenti* (Hertel *et al.*, 2002).

Jelikož se obě amplifikované sekvence oblasti Sau3A shodují z 92 % (Hertel *et al.*, 2002), výsledné teploty tání (T_m) obou produktů qPCR nevykazovaly žádné rozdíly mezi *T. regenti* a *T. szidati*. Možným řešením by byla aplikace metody HRM, kde se např. Li *et al.* (2015) podařilo odlišit 4 hlavní původce lidské schistosomózy, přičemž amplikony *S. japonicum* a *S. mekongi* disponovaly stejnou teplotou tání. Právě pomocí sledování průběhu křivky tání by mohlo dojít k mezidruhové determinaci zástupců rodu *Trichobilharzia* s použitím tohoto molekulárního markeru.

Zpočátku byly experimenty pro detekci parazitární DNA ve vzorcích krve obratlových hostitelů optimalizovány, především bylo nutné otestovat, která složka krve - plná krev, krevní plazma, krevní sérum bude nejvhodnější pro detekci parazitární cfDNA pomocí metody qPCR. Také bylo nutné otestovat, který protokol je pro izolaci DNA z takového vzorku nejvhodnější a pro tento účel byly testovány 3 komerčně dostupné „kolonkové“ kity pro izolaci DNA – DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®); Exgene™ Tissue SV (plus!) (GeneAid®) a QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®). Do vzorku krve byla přidávána předem známá koncentrace DNA z cercárií *T. regenti* a pro izolaci DNA byla použita právě obohacená plná krev, nebo krevní sérum či plazma. Výtěžky DNA z izolace byly následně kvantifikovány pomocí qPCR. Bylo zjištěno, že při izolaci DNA z plné krve, a to různými kity i postupy, dochází k inhibici PCR pravděpodobně přítomností hemoglobinu, což bylo také potvrzeno předchozími studiemi (Al-Soud *et al.*, 2000; Al-Soud and Rådström, 2001). U kachen navíc docházelo důsledkem přítomnosti jaderných erytrocytů k nasycení silikátové membrány izolační kolonky hostitelskou DNA na úkor parazitární DNA (Freed and Cann, 2006; Palinauskas *et al.*, 2013). V krevním séru a plazmě kachen už nebyla přítomna jádra erytrocytů, proto nedocházelo k nasycení membrány kolonky hostitelskou DNA a bylo dosaženo vyšších výtěžků parazitární DNA. U vzorků myši byly výtěžky parazitární DNA ze séra a plazmy také vyšší oproti plné krvi, zde se pravděpodobně jednalo o zmíněnou inhibici PCR přítomností hemoglobinu. Zároveň nebyly pozorovány zásadní rozdíly mezi krevním sérem a plazmou. Dle dříve popsanych diagnostických metod založených na detekci cfDNA lidských schistosom, bylo vybráno krevní sérum jako vhodný vstupní vzorek, který byl používán v našich dalších experimentech (Xu *et al.*, 2010, 2014; Guo *et al.*, 2012; Clerinx *et al.*, 2013; Cnops *et al.*, 2013; Wichmann *et al.*, 2013; Kato-Hayashi *et al.*, 2015;

Méabed *et al.*, 2016; Weerakoon *et al.*, 2016). V porovnání kitů a izolačních postupů bylo dosaženo nejlepších výsledků s DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®) a Exgene™ Tissue SV (plus!) (GeneAll®) s použitím protokolů pro izolaci DNA ze tkání. Mezi těmito dvěma kity nebyl v zásadě žádný rozdíl a byl tedy vybrán Exgene™ Tissue SV (plus!) (GeneAll®) především z ekonomických důvodů. Zajímavostí je, že protokoly pro izolaci z krve, nebo dokonce samotný kit pro izolaci z krve QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen®) vykazovaly pozorovatelně nižší výtěžky parazitární DNA.

6.4 Detekce parazitární cfDNA v krevním séru přirozených obratlovčích hostitelů

Ve vzorcích krevního séra optimalizační experimentální skupiny, zahrnující dvě experimentálně infikované kachny, se podařilo detekovat nadlimitní množství DNA *T. regenti* jak v časně fázi (1 dpi) tak v pozdní fázi (15 dpi a 22 dpi) infekce. Ve vlastní experimentální skupině bylo zahrnuto více vzorků (4 kachny infikované *T. szidati* a 5 kachen infikovaných *T. regenti*), které zároveň více časově odpovídaly ontogenezi ptačích schistosom v těle definitivního hostitele (Bourns *et al.*, 1973; Haas and Pietsch, 1991; Horák *et al.*, 1998a, 1999, 2002; Horák and Kolářová, 2000; Hrádková and Horák, 2002; Chanová and Horák, 2007; Chanová *et al.*, 2007). Podařilo se však detekovat nadlimitní množství DNA *T. regenti* pouze v jediném vzorku - 14 dpi. Tato doba odpovídá dosažení místa finální lokalizace, nosní dutiny, v životním cyklu *T. regenti* (Horák *et al.*, 1999; Hrádková and Horák, 2002; Chanová and Horák, 2007).

V několika studiích (na lidských i ptačích schistosomách) bylo popsáno, že okamžitě po penetraci hostitele není vysoký podíl schistosomul schopen pokračovat v migraci do dalších vrstev kůže a orgánů a je eliminován imunitním systémem (Clegg and Smithers, 1968; Rai and Clegg, 1968; Bourns *et al.*, 1973; Ellis *et al.*, 1975). Z tohoto důvodu byly očekávány obdobné výsledky, kterých docílili Xu *et al.*, (2013, 2017) u přirozených hostitelů (králíků a myší) experimentálně nakažených *S. japonicum*, kde metodu Nested PCR detekovali parazitární DNA ve vzorcích séra už 3 dpi i po nízké infekční dávce (5 cercárií). Jako molekulárního markeru využívali repetitivní sekvence SjR2, která je však zastoupena ve 14 % celého genomu *S. japonicum* (Laha *et al.*, 2002) ve srovnání s repetitivní sekvencí Sau3A např. u *T. regenti*, která zastupuje pouze z 2 % genomu (Hertel *et al.*, 2002) (pozn. u zástupců rodu *Trichobilharzia* nebyla odpovídající repetitivně sekvence s podobným procentuálním zastoupením nalezena). Ačkoliv byly použity rozdílné molekulární metody, popsány byly jen malé rozdíly v senzitivitě mezi oběma metodami – námi aplikované qPCR a Nested PCR (Fang *et al.*, 2002; Calderaro *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 2010). Hlavním důvodem zvýšeného detekčního limitu zaznamenaného v našich experimentech, ve srovnání s Xu *et al.*, (2013, 2017), by mohl být pravděpodobně rozdílný poměr

zastoupení jednotlivých využitých repetitivních sekvencí v genomu *Trichobilharzia* spp. a *S. japonicum*.

Ačkoliv byla popsána vysoká redukce v počtu migrujících schistosomul *T. szidati* během infekce, jak v kůži, tak v plicích přirozeného hostitele (Bourns *et al.*, 1973; Ellis *et al.*, 1975; Haas and Pietsch, 1991; Horák and Kolářová, 2000; Horák *et al.*, 2002) a současně byla popsána redukce dospělců v místě finální lokalizace okolo 21 dpi (Bourns *et al.*, 1973; Horák *et al.*, 2002), nepodařilo se nám u experimentálně infikovaných kachen detekovat parazitární DNA v žádném vzorku v průběhu infekce.

6.5 Detekce parazitární cfDNA v krevním séru náhodných obratlovčích hostitelů

Ve srovnání s přirozenými hostiteli byla detekce parazitární DNA u náhodných hostitelů úspěšnější. V optimalizační experimentální skupině 4 experimentálně infikovaných myší dvou kmenů (BALB/c a ICR) ptačí schistosomou *T. regenti* se podařilo detekovat parazitární DNA ve všech vzorcích, kromě jednoho. Největší množství cfDNA bylo zaznamenáno ve vzorcích v časně fázi infekce (1 dpi a 3 dpi) a tento fakt zůstal platný i pro vzorky z vlastní experimentální skupiny nakažené *T. regenti* i *T. szidati*. Tyto výsledky odpovídají výsledkům experimentů zabývajících se předpokladem, že je většina cercárií *Trichobilharzia* spp. eliminována imunitním systémem během krátké doby po penetraci kůže savčího hostitele, přičemž tyto cercárie jsou následně do 52 hodin kompletně destruovány (Haemmerli, 1953; Kouřilová *et al.*, 2004a, 2004b; Kolářová *et al.*, 2013). Z výsledků získaných z vlastní experimentální skupiny, zahrnující 4 myši experimentálně infikované *T. szidati* a celkem 26 myši experimentálně infikovaných *T. regenti*, je patné, že mezi 1. a 3. dnem po infekci dochází k rychlému poklesu koncentrace parazitární cfDNA v krvi hostitele (řádově až tisíckrát), což odpovídá *in vitro* studiím ohledně sledování rychlosti degradace experimentálně injikované cfDNA do krve myší, či *in vivo* studiím zaměřeným na sledování degradace fetální cfDNA v krvi žen po porodu (Gauthier *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2013).

Přestože jsou popsány případy migrace schistosomul do vnitřních orgánů náhodných savčích hostitelů (Appleton and Brock, 1986; Haas and Pietsch, 1991; Horák *et al.*, 1999, 2002; Horák and Kolářová, 2000; Hrádková and Horák, 2002; Chanová *et al.*, 2007) a dalo by se tedy předpokládat kontinuální uvolňování parazitární DNA do krevního oběhu hostitele, nepodařilo se nám detekovat parazitární DNA v žádném ze vzorků v pozdějších fázích infekce u vlastní experimentální skupiny zahrnující experimentálně infikované myši oběma druhy ptačích schistosom.

6.6 Detekce parazitární cfDNA v krevním séru nakažených lidí

Při tomto experimentu byla vytvořena hranice detekčního limitu ze vzorků sér 1 hodinu po infekci. Bylo tak učiněno, neboť nebyla k dispozici negativní séra a zároveň jsme chtěli dodržet stejné postupy jako v předešlých experimentech. Tato volba byla podpořena námi dosaženými výsledky, kdy ani jeden ze vzorků neobsahoval výrazně vyšší množství parazitární DNA. Ačkoliv bylo popsáno, že vysoký podíl cercárií zahyne bezprostředně po penetraci do náhodného hostitele (Haemmerli, 1953; Kouřilová *et al.*, 2004a, 2004b; Kolářová *et al.*, 2013), není pravděpodobné, že by v tak krátkém intervalu, jako je 1 hodina, došlo k jejich degradaci a distribuci jejich DNA do krve hostitele.

V našem experimentu se podařilo získat a zpracovat vzorky krevního séra 10 náhodně infikovaných lidí *T. szidati*. Parazitární DNA se podařilo detekovat pouze ve 2 vzorcích - 7 dpi a 2 vzorcích - 21 dpi. U těchto osob byly také provedeny imunologické studie (Macháček *et al.*, in preparation), které umožnily zaznamenat zvýšení počtu eozinofilů v krvi, zvýšení hladin specifických protilátek IgM (primoinfekce) a IgG (opakovaná infekce) proti antigenu *T. szidati* nebo zvýšení hladiny některých cytokinů, např. protizánětlivých IL-4. Všechna tato pozorování patří mezi běžné projevy helmintózy a byly také popsány u infekcí lidskými i ptačími schistosomami (Capron *et al.*, 1984; Khalife *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 1996; Kouřilová and Kolářová, 2002; Ganley-Leal *et al.*, 2006; Lichtenbergová *et al.*, 2008; Jauréguiberry *et al.*, 2010; Turjanicová *et al.*, 2015; Marti and Hatz, 2017). Imunologické metody sice zaznamenaly některé fyziologické změny související s infekcí *T. szidati* a tím způsobenou cercáriovou dermatitidou, avšak změny byly pozorovány v porovnání s hodnotami 1 hodinu po infekci. Oproti tomu námi použité molekulární metody nepotřebují srovnání s negativními či velice časnými vzorky, neboť detekční limit může být ustanoven předem, nezávisle na testovaných vzorcích.

Ačkoliv je publikováno mnoho studií, kde se podařilo detekovat cfDNA schistosom v lidském séru (Xu *et al.*, 2010, 2014; Guo *et al.*, 2012; Clerinx *et al.*, 2013; Cnops *et al.*, 2013; Wichmann *et al.*, 2013; Kato-Hayashi *et al.*, 2015; Méabed *et al.*, 2016; Weerakoon *et al.*, 2016), z našich výsledků však tato metoda není příliš vhodná pro determinaci původce cercáriové dermatitidy, jelikož se nám podařilo detekovat parazitární DNA pouze u 4 vzorků. Na druhou stranu byly testovány vzorky až 7 dpi, přičemž bylo u experimentálně infikovaných myší nejvíce pozitivních výsledků a největší naměřená množství parazitární DNA zaznamenána 1 dpi. Bylo by tedy vhodné otestovat lidská séra na přítomnost parazitární DNA 1 dpi, aby mohla být námi testovaná metoda relevantně posouzena.

Přestože výsledky získané v experimentech se vzorky obratlových hostitelů nejsou příliš průkazné, domnívám se, že použité metody mají ještě potenciál k vylepšení, např. nalezením v genomu ještě více zastoupené repetitivní sekvence. U kachen se podařilo detekovat parazitární DNA jen ve velmi omezeném počtu vzorků, které ale spadaly především do pozdní fáze infekce. U náhodných hostitelů - myši, byl pozorovaný trend opačný, kde byla cfDNA parazita detekována u velkého množství vzorků v časně fázi infekce. Tyto výsledky odpovídají vývoji ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* v různých skupinách obratlovců, neboť vysvětlují možný původ parazitární cfDNA a její koncentraci v krvi hostitele; u ptáků dochází k eliminaci menšího počtu cercárií a schistosomul v kůži a relativně velký podíl z nich dospívá, produkuje vajíčka a následně hyne (Bourns *et al.*, 1973; Horák *et al.*, 1999, 2002; Hrádková and Horák, 2002; Chanová and Horák, 2007), zatímco u náhodných savčích hostitelů dochází k jejich eliminaci brzy po penetraci a pouze velice malá část je schopna migrovat z kůže do dalších vnitřních orgánů (Haemmerli, 1953; Appleton and Brock, 1986; Haas and Pietsch, 1991; Horák *et al.*, 1999, 2002; Horák and Kolářová, 2001; Hrádková and Horák, 2002; Kouřilová *et al.*, 2004a, 2004b).

Pokud srovnáme námi dosažené výsledky se studiemi zaměřenými na detekci cfDNA lidských schistosom, nepodařilo se nám dosáhnout podobných výsledků. Zásadní příčinou neúspěchu může být rozdílné zastoupení vybraných molekulárních markerů (repetitivních sekvencí) v genomu lidských a ptačích schistosom. U všech tří hlavních původců lidské schistosomózy byly objeveny repetitivní sekvence s vysokým zastoupením v genomu, např. repetitivní sekvence Sm1-7 je u *S. mansoni* obsažena v 12 % genomu (Hamburger *et al.*, 1991); sekvence SjR2 zahrnuje přibližně 14 % celkového genomu *S. japonicum* (Laha *et al.*, 2002) a u *S. haematobium* je repetitivní sekvence DraI zastoupena dokonce v 15 % celého genomu parazita (Hamburger *et al.*, 2001). Oproti tomu jsou repetitivní sekvence Sau3A zastoupeny pouze ve 2 % genomu *T. regenti*; 1,5 % genomu *T. szidati* a 1 % genomu *T. franki* (Hertel *et al.*, 2002). Všechny tyto repetitivní sekvence jsou častými, úspěšně využívanými molekulárními markery (Pontes *et al.*, 2002; Wichmann *et al.*, 2009, 2013, Xu *et al.*, 2014, 2010; Ibrinke *et al.*, 2011; Enk *et al.*, 2012; Clerinx *et al.*, 2013; Cnops *et al.*, 2013; Lodh *et al.*, 2013, 2014). Rozdílností zastoupení repetitivní sekvence Sau3A v genomu *T. regenti* a *T. szidati* (2 % genomu *T. regenti* a 1,5 % genomu *T. szidati*) je pravděpodobně způsoben rozdílný detekční limit metody PCR, což vysvětluje i naše výsledky, kdy se nám podařilo zachytit cfDNA převážně při experimentálních infekcích *T. regenti*.

Vliv na naše výsledky může mít patrně i vstupní množství krevního séra, ze kterého byla izolována DNA. U publikovaných studií prezentujících úspěšnou detekci cfDNA lidských schistosom v krevním séru, byla ve většině případů DNA izolována ze vzorku o objemu 2 ml (Clerinx *et al.*, 2011; Cnops *et al.*, 2013; Wichmann *et al.*, 2013; Weerakoon *et al.*, 2016), zatímco v našem případě tento objem činil maximálně 100 µl. Větší objem vstupního materiálu však vyžaduje jiné izolační postupy (např. fenol-chloroformová extrakce), které nejsou omezeny

kapacitou, jako např. námi použité „kolonkové“ komerční kity. U myši také nebylo možné získat větší objem krevního séra bez nutnosti jejich usmrcení, možným řešením by proto bylo použití izolačních kitů přímo mířených na cfDNA, s jejich využitím by bylo možné docílit vyšších výtěžků (Sorber *et al.*, 2017).

6.7 Detekce parazitární DNA v nervové tkáni experimentálně nakažených myši

Jak již bylo výše zmíněno, schistosomula *T. regenti* jsou schopna migrovat do míchy myši jakožto náhodných hostitelů. Počet jedinců, kteří domigrují až do míchy je však velice nízký, dle pozorování Hrádkové and Horáka (2002) oblastí míchy dosáhne pouze necelé 1 % ze všech cercárií/schistosomul, kterým je myš exponovaná. To potvrzuje i pozorování Kouřilové *et al.* (2004a), kteří dokumentovali, že téměř 90 % parazitů zůstává po penetraci hostitele v kůži. V míše experimentálně infikovaných myši byla schistosomula pozorována už od 2 dpi do 24 dpi, většina schistosomul je zde však eliminována imunitním systémem hostitele. Byly však popsány ojedinělé nálezy schistosomul i v mozečku či hemisférách koncového mozku infikovaných myši mezi 3 dpi a 24 dpi (Hrádková and Horák, 2002; Kouřilová *et al.*, 2004a; Lichtenbergová *et al.*, 2011).

Naším cílem bylo ověřit přítomnost DNA *T. regenti* ve vzorcích homogenizované míchy a mozku (bez mozečku) experimentálně infikovaných myši. I když se vždy jednalo jen o minimální množství tkáně z celého orgánu (analyzována byla pouze tkáň, která zůstala po přefiltrování buněčné suspenze v sítku, zbytek byl využit pro průtokovou cytometrii (Macháček, nepublikováno), bylo možné v některých vzorcích parazitární DNA zachytit. U všech myši 7 dpi a 14 dpi se podařilo detekovat vysoké množství parazitární DNA (řádově pikogramy) ve vzorcích míchy, zatímco u vzorků mozku jich bylo pozitivních pouze několik. U většiny myši se podařilo detekovat DNA *T. regenti* v míše 21 dpi a u menšího počtu i 28 dpi. Ve vzorcích mozku byla parazitární DNA detekována jen u některých myši (<50 %), vždy se až na jednu výjimku (7 dpi) jednalo o vzorky 14 dpi a 21 dpi. Naše výsledky tedy odpovídají předpokládané migraci parazita v CNS myši a korelují s intenzitou buněčné imunitní odpovědi v postižené tkáni. To podporuje hypotézu, že většina schistosomul proniknuvších do CNS končí svoji migraci v míše (Hrádková and Horák, 2002; Lichtenbergová *et al.*, 2011; Macháček, nepublikováno). V případě mozku, kde byl záchyt parazitární DNA méně častý, nelze s využitím qPCR rozhodnout, zda pozitivní výsledek značí přítomnost živého či mrtvého parazita, či zda jde o volnou DNA parazita usmrceného v míše, která difunduje nervovou tkání. K rozřešení této otázky by mohly přispět kupříkladu 3D zobrazovací metody s vhodným rozlišením, které zachytí i schistosomula (např. mikro-CT), jež byly recentně použity pro sledování migrace schistosomul *T. regenti* v kachnách (Bulantová *et al.*, 2016).

7 Závěr

V této práci byly shrnuty dosavadní poznatky ohledně molekulární diagnostiky motolic, především se zaměřením na schistosomy. Hlavním cílem této práce bylo navrhnout a optimalizovat vhodnou molekulárně-diagnostickou metodu, kterou by bylo možné determinovat dva důležité původce cercáriové dermatitidy, *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*. Tato práce se zaměřila na detekci cell-free DNA v tělních tekutinách přirozených i náhodných hostitelů pomocí metody PCR.

V této práci bylo dosaženo těchto poznatků:

- Primery pro repetitivní sekvenci Sau3A motolic rodu *Trichobilharzia* jsou vhodnými molekulárními markery kvůli vysokému zastoupení v genomu, avšak pouze pro determinaci rodu, nikoliv pro mezidruhovou determinaci ptačích motolic.
- S využitím repetitivní sekvence Sau3A se pomocí konvenční PCR podařilo diagnostikovat infekci *T. regenti* a *T. szidati* ve všech vzorcích hemolymfy experimentálně nakažených plžů *Radix lagotis* a *Lymnaea stagnalis*. Zároveň lze stejného vzorku využít pro determinaci hostitelského plže.
- U experimentálně nakažených kachen se podařilo v krevním séru detekovat cfDNA *T. regenti* a *T. szidati* pouze omezeném počtu vzorků. Tato metoda proto není příliš vhodná pro diagnostické využití u přirozených hostitelů.
- U experimentálně nakažených myší se podařilo v krevním séru detekovat cfDNA *T. regenti* a *T. szidati* především u vzorků 1 dpi a 3 dpi. Tato metoda by proto mohla být u náhodných hostitelů využitelná pro diagnostiku v časných fázích infekce.
- U náhodně nakažených lidí se podařilo v krevním séru detekovat cfDNA *T. szidati* pouze v několika vzorcích. Za účelem dalšího zhodnocení aplikované metody by bylo vhodné analyzovat vzorky z chybějících odběrů v časně fázi infekce.
- Rozdílné zastoupení repetitivní sekvence Sau3A v genomu *T. regenti* a *T. szidati* má pravděpodobně vliv na rozdílný detekční limit metody PCR a s tím související dosažení lepších výsledků u experimentálních nákaz *T. regenti*.

- Pomocí qPCR se podařilo prokázat přítomnost DNA *T. regenti* ve vzorcích CNS experimentálně nakažených myší. Naše výsledky odpovídají ontogenezi parazita i výsledkům z průtokové cytometrie.

Podařilo se nám navrhnout novou neinvazivní metodu pro determinaci ptačích schistosom a mezihostitelských plžů. Tato metoda by mohla být používána v terénních studiích pro mapování výskytu ptačích schistosom a případně i dalších druhů motolic. Navržená molekulárně-diagnostická metoda založená na detekci cfDNA *Trichobilharzia* spp. v krevním séru hostitelů však byla méně úspěšná. Dle našich výsledků by tato metoda mohla být využitelná v časně fázi infekce, ale bylo by nutné provést další optimalizační kroky.

8 Seznam použité literatury

1. **Abath, F. G. and Werkhauser, R. C. (1996)** 'The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features.', *Parasite immunology*, 18(1), pp. 15–20.
2. **Abbasi, I., King, C. H., Muchiri, E. M. and Hamburger, J. (2010)** 'Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: Identification of infected snails from early prepatency', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(2), pp. 427–432.
3. **Ai, L., Li, C., Elsheikha, H. M., Hong, S. J., Chen, J. X., Chen, S. H., Li, X., Cai, X. Q., Chen, M. X. and Zhu, X. Q. (2010)** 'Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay', *Veterinary Parasitology*, 174(3–4), pp. 228–233.
4. **Al-Shehri, H., Koukounari, A., Stanton, M. C., Adriko, M., Arinaitwe, M., Atuhaire, A., Kabatereine, N. B. and Stothard, J. R. (2018)** 'Surveillance of intestinal schistosomiasis during control: a comparison of four diagnostic tests across five Ugandan primary schools in the Lake Albert region', *Parasitology*. Cambridge University Press, pp. 1–8.
5. **Al-Soud, W. A., Jönsson, L. J. and Rådström, P. (2000)** 'Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1), pp. 345–350.
6. **Al-Soud, W. A. and Rådström, P. (2001)** 'Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells', *Journal of Clinical Microbiology*, 39(2), pp. 485–493.
7. **Alasaad, S., Huang, C. Q., Li, Q. Y., Granados, J. E., García-Romero, C., Pérez, J. M. and Zhu, X. Q. (2007)** 'Characterization of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities in Spain by sequences of internal transcribed spacers of rDNA', *Parasitology Research*, 101(5), pp. 1245–1250.
8. **Alasaad, S., Soriguer, R. C., Abu-Madi, M., El Behairy, A., Jowers, M. J., Baños, P. D., Píriz, A., Fickel, J. and Zhu, X. Q. (2011)** 'A TaqMan real-time PCR-based assay for the identification of *Fasciola* spp.', *Veterinary Parasitology*, 179(1–3), pp. 266–271.
9. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2008)** *Molecular biology of the cell*, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, Biochemistry and Molecular Biology Education.
10. **Almeyda-artigas, A. R. J., Barges, M. D. and Mas-coma, S. (2000)** 'ITS-2 rDNA sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the americas elucidation of the species causing human gnathostomiasis in', *The Journal of parasitology*, 86(3), pp. 537–544.
11. **Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X. Q. and Stroun, M. (1999)** 'Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients.', *Cancer and Metastasis reviews*, 18(1), pp. 65–73.
12. **Appleton, C. C. and Brock, K. (1986)** 'The penetration of mammalian skin by cercariae of *Trichobilharzia* sp. (Trematoda: Schistosomatidae) from South Africa.', *The Onderstepoort journal of veterinary research*. South Africa, 53(4), pp. 209–211.
13. **Arimatsu, Y., Kaewkes, S., Laha, T., Hong, S. J. and Sripa, B. (2012)** 'Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *Parasitology International*, 61(1), pp. 178–182.
14. **Aryeetey, Y. A., Essien-Baidoo, S., Larbi, I. A., Ahmed, K., Amoah, A. S., Obeng, B. B., Van Lieshout, L., Yazdanbakhsh, M., Boakye, D. A. and Verweij, J. J. (2013)** 'Molecular diagnosis of *Schistosoma* infections in urine samples of school children in Ghana', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), pp. 1028–1031.
15. **Bahgat, M., Francklow, K., Doenhoff, M. J., Li, Y. L., Ramzy, R. M. R., Kirsten, C. and Ruppel, A. (2001)** 'Infection induces antibodies against the cercarial secretions, but not against the cercarial elastases of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* and *Trichobilharzia ocellata*', *Parasite Immunology*, 23(10), pp. 557–565.
16. **Barber, K. E., Mkoji, G. M. and Loker, E. S. (2000)** 'PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify *Schistosoma haematobium* and *S. bovis* from Kenya', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(4), pp. 434–440.
17. **Barral, V., This, P., Imbert-Establet, D., Combes, C. and Delseny, M. (1993)** 'Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers.', *Molecular and biochemical parasitology*, 59(2), pp. 211–21.

18. **Bastian, P. J., Palapattu, G. S., Yegnasubramanian, S., Lin, X., Rogers, C. G., Mangold, L. A., Trock, B., Eisenberger, M., Partin, A. W. and Nelson, W. G. (2007)** 'Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy', *Clinical Cancer Research*, 13(18), pp. 5361–5367.
19. **Benson, G. (1999)** 'Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences', *Nucleic Acids Research*, 27(2), pp. 573–580.
20. **Berry, O. and Sarre, S. D. (2007)** 'Gel-free species identification using melt-curve analysis', *Molecular Ecology Notes*, 7(1), pp. 1–4.
21. **Bio-Rad Laboratories (2000)** 'Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin Instruction Manual', *Bio-Rad Laboratories*, pp. 1–24.
22. **Biscotti, M. A., Olmo, E. and Heslop-Harrison, J. S. P. (2015)** 'Repetitive DNA in eukaryotic genomes.', *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 23(3), pp. 415–20.
23. **Blair, D. and Islam, K. S. (1983)** 'The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n.sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*', *Systematic Parasitology*, 5(2), pp. 89–117.
24. **Blair, D. and McManus, D. P. (1989)** 'Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36(3), pp. 201–208.
25. **Blin, N. and Stafford, D. W. (1976)** 'A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes', *Nucleic Acids Research*, 3(9), pp. 2303–2308.
26. **Boon, N. A. M., Fannes, W., Rombouts, S., Polman, K., Volckaert, F. A. M. and Huyse, T. (2017)** 'Detecting hybridization in African schistosome species: does egg morphology complement molecular species identification?', *Parasitology*. Cambridge University Press, 144(7), pp. 954–964.
27. **Bourns, T. K., Ellis, F. C. and Rau, M. E. (1973)** 'Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck hosts', *Canadian journal of zoology*, 51(10), pp. 1021–1030.
28. **Bowles, J. and McManus, D. P. (1993)** 'Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57(2), pp. 231–239.
29. **Brant, S. V., Bochte, C. a. and Loker, E. S. (2011)** 'New Intermediate Host Records for the Avian Schistosomes *Dendritobilharzia pulverulenta*, *Gigantobilharzia huronensis*, and *Trichobilharzia querquedulae* From North America', *Journal of Parasitology*, 97(5), pp. 946–949.
30. **Bulantová, J., Macháček, T., Panská, L., Krejčí, F., Karch, J., Jährling, N., Saghafi, S., Dodt, H. U. and Horák, P. (2016)** '*Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates', *Micron*, 83, pp. 62–71.
31. **Bustin, S. a, Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. and Wittwer, C. T. (2009)** 'The MIQE Guidelines : Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments', *Clinical chemistry*, 55(4), pp. 611–622.
32. **Cady, N. C., Stelick, S. and Batt, C. A. (2003)** 'Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures', *Biosensors and Bioelectronics*, 19(1), pp. 59–66.
33. **Cai, X. Q., Xu, M. J., Wang, Y. H., Qiu, D. Y., Liu, G. X., Lin, A., Tang, J. D., Zhang, R. L. and Zhu, X. Q. (2010)** 'Sensitive and rapid detection of *Clonorchis sinensis* infection in fish by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *Parasitology Research*, 106(6), pp. 1379–1383.
34. **Cai, X. Q., Yu, H. Q., Bai, J. S., Tang, J. D., Hu, X. C., Chen, D. H., Zhang, R. L., Chen, M. X., Ai, L. and Zhu, X. Q. (2012)** 'Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of *Clonorchis sinensis* DNA in human stool samples and fishes', *Parasitology International*, 61(1), pp. 183–186.
35. **Cai, X.-Q., Yu, H.-Q., Li, R., Yue, Q.-Y., Liu, G.-H., Bai, J.-S., Deng, Y., Qiu, D.-Y. and Zhu, X.-Q. (2014)** 'Rapid detection and differentiation of *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* using real-time PCR and high resolution melting analysis.', *The Scientific World Journal*, 2014(2), pp. 893981–893986.
36. **Calderaro, A., Piccolo, G., Gorrini, C., Peruzzi, S., Zerbini, L., Bommezzadri, S., Dettori, G. and Chezzi, C. (2006)** 'Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*', *Acta Biomed*, 77(2), pp. 75–80.
37. **Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V. and Jackson, R. B. (2008)** 'Biology', in *Biology*, pp. 149–177.

38. **Capron, M., Nogueira-Queiroz, J. A., Papin, J. P. and Capron, A. (1984)** 'Interactions between eosinophils and antibodies: In vivo protective role against rat schistosomiasis', *Cellular Immunology*, 83(1), pp. 60–72.
39. **Clark, D. M. (2010)** *Molecular Biology, Elsevier Academic Press*.
40. **Clegg, J. A. and Smithers, S. R. (1968)** 'Death of schistosome cercariae during penetration of the skin: II. Penetration of mammalian skin by *Schistosoma mansoni*', *Parasitology*, 58(1), pp. 111–128.
41. **Clerinx, J., Bottieau, E., Wichmann, D., Tannich, E. and Van Esbroeck, M. (2011)** 'Acute Schistosomiasis in a Cluster of Travelers From Rwanda: Diagnostic Contribution of Schistosome DNA Detection in Serum Compared to Parasitology and Serology', *Journal of Travel Medicine*. Oxford University Press, 18(6), pp. 367–372.
42. **Clerinx, J., Cnops, L., Huyse, T., Tannich, E. and Van Esbroeck, M. (2013)** 'Diagnostic issues of acute schistosomiasis with *Schistosoma mekongi* in a traveler: A case report', *Journal of Travel Medicine*, 20(5), pp. 322–325.
43. **Cnops, L., Soentjens, P., Clerinx, J. and van Esbroeck, M. (2013)** 'A *Schistosoma haematobium*-Specific Real-Time PCR for Diagnosis of Urogenital Schistosomiasis in Serum Samples of International Travelers and Migrants', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8).
44. **Cort, W. W. (1928)** 'Schistosome dermatitis in the United States (Michigan)', *Journal of the American Medical Association*, 90(13), pp. 1027–1029.
45. **Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P. and Utzinger, J. (2010)** 'FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans', *Nature Protocols*, 5(3), pp. 503–515.
46. **Cucher, M. A., Carnevale, S., Prepelitchi, L., Labbé, J. H. and Wisnivesky-Colli, C. (2006)** 'PCR diagnosis of *Fasciola hepatica* in field-collected *Lymnaea columella* and *Lymnaea viatrix* snails', *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), pp. 74–82.
47. **Dabo, A., Durand, P., Morand, S., Diakite, M., Langand, J., Imbert-Establet, D., Doumbo, O. and Jourdane, J. (1997)** 'Distribution and genetic diversity of *Schistosoma haematobium* within its bulinid intermediate hosts in Mali', *Acta Tropica*, 66(1), pp. 15–26.
48. **Davies, C. M., Webster, J. P., Krüger, O., Munatsi, A., Ndamba, J. and Woolhouse, M. E. J. (1999)** 'Host-parasite population genetics: A cross-sectional comparison of *Bulinus globosus* and *Schistosoma haematobium*', *Parasitology*, 119(3), pp. 295–302.
49. **Dennis Lo, Y. M. and Chiu, R. W. K. (2007)** 'Innovations: Prenatal diagnosis: Progress through plasma nucleic acids', *Nature Reviews Genetics*, pp. 71–77.
50. **Despres, L. and Maurice, S. (1995)** 'The Evolution of Dimorphism and Separate Sexes in Schistosomes', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 262(1364), pp. 175–180.
51. **Dhaliwal, A. (2013)** *DNA Extraction and Purification, Materials and Methods*.
52. **Dias Neto, E., Steindel, M., Passos, L. K., de Souza, C. P., Rollinson, D., Katz, N., Romanha, A. J., Pena, S. D. and Simpson, A. J. (1993)** 'The use of RAPDs for the study of the genetic diversity of *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*.', *EXS*, 67, pp. 339–345.
53. **Dikkeboom, R., Bayne, C. J., van der Knaap, W. P. W. and Tijnagel, J. M. G. H. (1988)** 'Possible role of reactive forms of oxygen in in vitro killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes of *Lymnaea stagnalis*', *Parasitology Research*, 75(2), pp. 148–154.
54. **Dolečková, K., Kašný, M., Mikeš, L., Cartwright, J., Jedelský, P., Schneider, E. L., Dvořák, J., Mountford, A. P., Craik, C. S. and Horák, P. (2009)** 'The functional expression and characterisation of a cysteine peptidase from the invasive stage of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*', *International Journal for Parasitology*, 39(2), pp. 201–211.
55. **Dunbar, S. A. (2006)** 'Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection', *Clinica Chimica Acta*, pp. 71–82.
56. **Dvořák, J., Vaňáčová, Š., Hampl, V., Flegr, J. and Horák, P. (2002)** 'Comparison of European *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences', *Parasitology*, 124(3), pp. 307–313.
57. **Eamsobhana, P. and Yong, H. Sen (2009)** 'Immunological diagnosis of human angiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae)', *International Journal of Infectious Diseases*, pp. 425–431.
58. **Ebbs, E. T., Loker, E. S., Davis, N. E., Flores, V., Veleizan, A. and Brant, S. V. (2016)** 'Schistosomes with wings: how host phylogeny and ecology shape the global distribution of *Trichobilharzia querquedulae* (Schistosomatidae)', *International Journal for Parasitology*, 46(10), pp. 669–677.
59. **Ellis, J. E., Bourns, T. K. R. and Rau, E. (1975)** 'Migration, development, and condition of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in homologous challenge infections', *Canadian Journal of Zoology*, 53(12), pp. 1803–1811.

60. **Enk, M. J., Oliveira e Silva, G. and Rodrigues, N. B. (2012)** 'Diagnostic accuracy and applicability of a PCR system for the detection of *Schistosoma mansoni* DNA in human urine samples from an endemic area', *PLoS ONE*, 7(6).
61. **Etges, F. J., Carter, O. S. and Webbe, G. (1975)** 'Behavioral and developmental physiology of schistosome larvae as related to their molluscan hosts', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 266(1), pp. 480–496.
62. **Fang, Y., Wu, W.-H., Pepper, J. L., Larsen, J. L., Marras, S. A. E., Nelson, E. A., Epperson, W. B. and Christopher-Hennings, J. (2002)** 'Comparison of real-time, quantitative PCR with molecular beacons to nested PCR and culture methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine fecal samples', *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp. 287–291.
63. **Faust, E. C., Sawitz, W., Tobie, J., Odom, V., Peres, C. and Lincicome, D. R. (1939)** 'Comparative Efficiency of Various Techniques for the Diagnosis of Protozoa and Helminths in Feces', *The Journal of Parasitology*. Allen Press/The American Society of Parasitologists, 25(3), p. 241.
64. **Fernández-Soto, P., Gandasegui Arahuetes, J., Sánchez Hernández, A., López Abán, J., Vicente Santiago, B. and Muro, A. (2014)** 'A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Early Detection of *Schistosoma mansoni* in Stool Samples: A Diagnostic Approach in a Murine Model', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9).
65. **Ferre, F. (1992)** 'Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth', *Genome Research*, 2(1), pp. 1–9.
66. **Ferrer, E., Perez, F., Bello, I., Bolivar, A., Lares, M., Osorio, A., Leon, L., Amarista, M. and Incani, R. N. (2015)** 'Polymerase chain reaction for the amplification of the 121-bp repetitive sequence of *Schistosoma mansoni*: a highly sensitive potential diagnostic tool for areas of low endemicity', *Journal of Helminthology*, 89(6), pp. 769–773.
67. **Ferté, H., Depaquit, J., Carré, S., Villena, I. and Léger, N. (2005)** 'Presence of *Trichobilharzia szidati* in *Lymnaea stagnalis* and *T. franki* in *Radix auricularia* in northeastern France: Molecular evidence', *Parasitology Research*, 95(2), pp. 150–154.
68. **Fiegl, H., Millinger, S., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Ensinger, C., Berger, A., Klocker, H., Goebel, G. and Widschwendter, M. (2005)** 'Circulating tumor-specific DNA: A marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients', *Cancer Research*, 65(4), pp. 1141–1145.
69. **Fink, D. L., Fahle, G. A., Fischer, S., Fedorko, D. F. and Nutman, T. B. (2011)** 'Toward molecular parasitologic diagnosis: Enhanced diagnostic sensitivity for filarial infections in mobile populations', *Journal of Clinical Microbiology*, 49(1), pp. 42–47.
70. **Fleischhacker, M. and Schmidt, B. (2007)** 'Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer - A survey', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1775(1), pp. 181–232.
71. **Freed, L. a and Cann, R. L. (2006)** 'DNA Quality and Accuracy of Avian Malaria PCR Diagnostics: A Review', *The Condor*, 108(2), pp. 459–473.
72. **Fung, M. S., Xiao, N., Wang, S. and Carlton, E. J. (2012)** 'Field evaluation of a PCR test for *Schistosoma japonicum* egg detection in low-prevalence regions of China', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(6), pp. 1053–1058.
73. **Galappaththi-Arachchige, H. N., Holmen, S., Koukounari, A., Kleppa, E., Pillay, P., Sebitloane, M., Ndhlovu, P., Van Lieshout, L., Vennervald, B. J., Gundersen, S. G., Taylor, M. and Kjetland, E. F. (2018)** 'Evaluating diagnostic indicators of urogenital *Schistosoma haematobium* infection in young women: A cross sectional study in rural South Africa', *PLoS ONE*, 13(2).
74. **Gandasegui, J., Fernández-Soto, P., Hernández-Goenaga, J., López-Abán, J., Vicente, B. and Muro, A. (2016)** 'Biompha-LAMP: A New Rapid Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Detecting *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata* Snail Host', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(12).
75. **Ganley-Leal, L. M., Mwinzi, P. N., Cetre-Sossah, C. B., Andove, J., Hightower, A. W., Karanja, D. M. S., Colley, D. G. and Secor, W. E. (2006)** 'Correlation between eosinophils and protection against reinfection with *Schistosoma mansoni* and the effect of human immunodeficiency virus type 1 coinfection in humans', *Infection and Immunity*, 74(4), pp. 2169–2176.
76. **Garcia, L. S. (2009)** 'Practical guide to diagnostic parasitology', *American Society for Microbiology Press*.
77. **Gauthier, V. J., Tyler, L. N. and Mannik, M. (1996)** 'Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(3), pp. 1151–6.
78. **Georgi, J. R. (1969)** 'Parasitology for veterinarians.', *Parasitology for veterinarians*.

79. Ghayour Najafabadi, Z., Oormazdi, H., Akhlaghi, L., Meamar, A. R., Nateghpour, M., Farivar, L. and Razmjou, E. (2014) 'Detection of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* DNA in human saliva and urine: Loop-mediated isothermal amplification for malaria diagnosis', *Acta Tropica*, 136(1), pp. 44–49.
80. Glinz, D., Silué, K. D., Knopp, S., Lohourignon, L. K., Yao, K. P., Steinmann, P., Rinaldi, L., Cringoli, G., N'Goran, E. K. and Utzinger, J. (2010) 'Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga Agar Plate, Ether-Concentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and Soil-transmitted helminths', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(7).
81. Goessl, C. (2003) 'Diagnostic potential of circulating nucleic acids for oncology', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, pp. 431–442.
82. Gomes, L. I., Marques, L. H. dos S., Enk, M. J., de Oliveira, M. C., Coelho, P. M. Z. and Rabello, A. (2010) 'Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of *Schistosoma* infection in feces', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4).
83. Gonçalves, M. L. C., Araújo, A. and Ferreira, L. F. (2003) 'Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, pp. 103–118.
84. Gordon, C. A., Gray, D. J., Gobert, G. N. and McManus, D. P. (2011) 'DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans', *Molecular and Cellular Probes*, pp. 143–152.
85. Gordon, C. A., Acosta, L. P., Gray, D. J., Olveda, R. M., Jarilla, B., Gobert, G. N., Ross, A. G. and McManus, D. P. (2012) 'High Prevalence of *Schistosoma japonicum* Infection in Carabao from Samar Province, the Philippines: Implications for Transmission and Control', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9).
86. Gordon, C. A., Acosta, L. P., Gobert, G. N., Olveda, R. M., Ross, A. G., Williams, G. M., Gray, D. J., Harn, D., Li, Y. and McManus, D. P. (2015) 'Real-time PCR Demonstrates High Prevalence of *Schistosoma japonicum* in the Philippines: Implications for Surveillance and Control', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1).
87. Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P. and Hainaut, P. (2007) 'Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: Practical aspects and biological significance', *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 635(2–3), pp. 105–117.
88. Gottstein, B. (1992) 'Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis', *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 248–261.
89. Gunson, R. N., Bennett, S., Maclean, A. and Carman, W. F. (2008) 'Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service', *Journal of Clinical Virology*, 43(4), pp. 372–375.
90. Guo, J. J., Zheng, H. J., Xu, J., Zhu, X. Q., Wang, S. Y. and Xia, C. M. (2012) 'Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(3).
91. Haas, W. and Pietsch, U. (1991) 'Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host', *Parasitology Research*, 77(7), pp. 642–644.
92. Haemmerli, U. (1953) 'Schistosomen-Dermatitis am Zürichsee', *Dermatology*. Karger Publishers, 107(5), pp. 302–341.
93. Hahn, U. K., Bender, R. C. and Bayne, C. J. (2001) 'Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*.', *The Journal of parasitology*, 87(4), pp. 778–785.
94. Haines, A. M., Tobe, S. S., Kobus, H. J. and Linacre, A. (2015) 'Properties of nucleic acid staining dyes used in gel electrophoresis', *Electrophoresis*, 36(6), pp. 941–944.
95. Hamburger, J., Turetski, T., Kapeller, I. and Deresiewicz, R. (1991) 'Highly repeated short DNA sequences in the genome of *Schistosoma mansoni* recognized by a species-specific probe', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44(1), pp. 73–80.
96. Hamburger, J., Xu, Y. X., Ramzy, R. M., Jourdane, J. and Ruppel, A. (1998) 'Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water', *Am J Trop Med Hyg*, 59(3), pp. 468–473.
97. Hamburger, J., He, N., Abbasi, I., Ramzy, R. M., Jourdane, J. and Ruppel, A. (2001) 'Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water', *Am J Trop Med Hyg*, 65(6), pp. 907–911.
98. Hamburger, J., Abbasi, I., Kariuki, C., Wanjala, A., Mzungu, E., Mungai, P., Muchiri, E. and King, C. H. (2013) 'Evaluation of loop-mediated isothermal amplification suitable for molecular monitoring of schistosome-infected snails in field laboratories', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(2), pp. 344–351.

99. **Hamilton, J. V., Klinkert, M. and Doenhoff, M. J. (1998)** 'Diagnosis of schistosomiasis: antibody detection, with notes on parasitological and antigen detection methods.', *Parasitology*, 117 Suppl, pp. S41-57.
100. **Hanelt, B., Adema, C. M., Mansour, M. H. and Loker, E. S. (1997)** 'Detection of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria* Using Nested PCR', *The Journal of Parasitology*, 83(3), p. 387.
101. **Harris, A. R. C., Russell, R. J. and Charters, A. D. (1984)** 'A review of schistosomiasis in immigrants in Western Australia, demonstrating the unusual longevity of *Schistosoma mansoni*', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(3), pp. 385-388.
102. **Härter, G., Frickmann, H., Zenk, S., Wichmann, D., Ammann, B., Kern, P., Fleischer, B., Tannich, E. and Poppert, S. (2014)** 'Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum', *Journal of Medical Microbiology*, 63(PART 2), pp. 309-312.
103. **Hawkins, T. (1999)** 'DNA purification and isolation using magnetic particles', *US Patent* 5,989,071.
104. **He, P., Gordon, C. A., Williams, G. M., Li, Y., Wang, Y., Hu, J., Gray, D. J., Ross, A. G., Harn, D. and McManus, D. P. (2018)** 'Real-time PCR diagnosis of *Schistosoma japonicum* in low transmission areas of China.', *Infectious diseases of poverty*. BioMed Central, 7(1), p. 8.
105. **Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M. (1996)** 'Real time quantitative PCR.', *Genome Research*, 6(10), pp. 986-994.
106. **Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H. and Vogt, P. H. (1997)** 'Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol', *BioTechniques*, 23(3), pp. 504-511.
107. **Hertel, J., Hamburger, J., Haberl, B. and Haas, W. (2002)** 'Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization', *Experimental Parasitology*, 101(1), pp. 57-63.
108. **Hertel, J., Kedves, K., Hassan, A. H. M., Haberl, B. and Haas, W. (2004)** 'Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR', *Acta Tropica*, 91(1), pp. 43-46.
109. **Hillis, D. M. and Dixon, M. T. (1991)** 'Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference', *The Quarterly Review of Biology*, 66(4), pp. 411-453.
110. **Horák, P., Kolářová, L. and Dvořák, J. (1998a)** '*Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe.', *Parasite (Paris, France)*, 5(4), pp. 349-357.
111. **Horák, P., Kovář, L., Kolářová, L. and Nebesářová, J. (1998b)** 'Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact', *Parasitology*, 116(2), pp. 139-147.
112. **Horák, P., Dvořák, J., Kolářová, L. and Trefil, L. (1999)** '*Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems', *Parasitology*, 119(6), pp. 577-581.
113. **Horák, P. and Kolářová, L. (2000)** 'Survival of bird schistosomes in mammalian lungs', *International Journal for Parasitology*, 30(1), pp. 65-68.
114. **Horák, P. and Kolářová, L. E. (2001)** 'Bird schistosomes: Do they die in mammalian skin?', *Trends in Parasitology*, pp. 66-69.
115. **Horák, P., Kolářová, L. and Adema, C. M. (2002)** 'Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*', *Advances in Parasitology*, pp. 155-233.
116. **ten Hove, R. J., Verweij, J. J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L. and van Lieshout, L. (2008)** 'Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal', *Trans.R.Soc.Trop.Med Hyg.*, 102(0035-9203 (Print)), pp. 179-185.
117. **Hrádková, K. and Horák, P. (2002)** 'Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice.', *Journal of helminthology*, 76(2), pp. 137-141.
118. **Hu, M., Chilton, N. B. and Gasser, R. B. (2003)** 'The Mitochondrial Genomics of Parasitic Nematodes of Socio-Economic Importance: Recent Progress, and Implications for Population Genetics and Systematics', *Advances in Parasitology*, pp. 133-212.
119. **Humphries, J. E. and Yoshino, T. P. (2008)** 'Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*', *Developmental and Comparative Immunology*, 32(5), pp. 554-562.
120. **Huňová, K., Kašný, M., Hampl, V., Leontovyč, R., Kuběna, A., Mikeš, L. and Horák, P. (2012)** '*Radix* spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic', *Acta Parasitologica*, 57(3), pp. 273-284.
121. **Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N. and Thomas, C. (1988)** 'Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification', *Nucleic Acids Research*, 16(23), pp. 11141-11156.

122. Chanová, M. and Horák, P. (2007) 'Terminal phase of bird schistosomiasis caused by *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae) in ducks (*Anas platyrhynchos f. domestica*)', *Folia Parasitologica*, 54(2), pp. 105–107.
123. Chanová, M., Vuong, S. and Horák, P. (2007) '*Trichobilharzia szidati*: The lung phase of migration within avian and mammalian hosts', *Parasitology Research*, 100(6), pp. 1243–1247.
124. Chanová, M., Bulantová, J., Máslo, P. and Horák, P. (2009) 'In vitro cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae)', *Parasitology Research*, 104(6), pp. 1445–1452.
125. Chen, M. X., Ai, L., Zhang, R. L., Xia, J. J., Wang, K., Chen, S. H., Zhang, Y. N., Xu, M. J., Li, X., Zhu, X. Q. and Chen, J. X. (2011) 'Sensitive and rapid detection of *Paragonimus westermani* infection in humans and animals by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *Parasitology Research*, 108(5), pp. 1193–1198.
126. Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., Gao, Y., Lau, V. Y. M., Zheng, W., Leung, T. Y., Foo, C. H. F., Xie, B., Tsui, N. B. Y., Lun, F. M. F., Zee, B. C. Y., Lau, T. K., Cantor, C. R. and Lo, Y. M. D. (2008) 'Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), pp. 20458–20463.
127. Cho, P. Y., Na, B.-K., Choi, K. M., Kim, J. S., Cho, S.-H., Lee, W.-J., Lim, S.-B., Cha, S. H., Park, Y.-K., Pak, J. H., Lee, H.-W., Hong, S.-J. and Kim, T.-S. (2013) 'Development of a polymerase chain reaction applicable to rapid and sensitive detection of *Clonorchis sinensis* eggs in human stool samples.', *Pathogens and global health*, 107(5), pp. 253–9.
128. Ibrónke, O. a, Phillips, A. E., Garba, A., Lamine, S. M. and Shiff, C. (2011) 'Diagnosis of *Schistosoma haematobium* by detection of specific DNA fragments from filtered urine samples.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 84(6), pp. 998–1001.
129. Intapan, P. M., Kosuwan, T., Wongkham, C. and Maleewong, W. (2004) 'Genomic characterization of lung flukes, *Paragonimus heterotremus*, *P. siamensis*, *P. harinasutai*, *P. westermani* and *P. bangkokensis* by RAPD markers', *Veterinary Parasitology*, 124(1–2), pp. 55–64.
130. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D. and Knippers, R. (2001) 'DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells', *Cancer Research*, 61(4), pp. 1659–1665.
131. Jannotti-Passos, L. K., Vidigal, T. H. D. A., Dias-Neto, E., Pena, S. D. J., Simpson, A. J. G., Dutra, W. O., Souza, C. P. and Carvalho-Parra, J. F. (1997) 'PCR Amplification of the Mitochondrial DNA Minisatellite Region to Detect *Schistosoma mansoni* Infection in *Biomphalaria glabrata* Snails', *The Journal of Parasitology*, 83(3), p. 395.
132. Jannotti-Passos, L. K., Magalhães, K. G., Carvalho, O. S. and Vidigal*, T. H. D. A. (2006) 'Multiplex PCR for both Identification of Brazilian *Biomphalaria* Species (Gastropoda: Planorbidae) and Diagnosis of Infection by *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae)', *Journal of Parasitology*, 92(2), pp. 401–403.
133. Jauréguiberry, S., Paris, L. and Caumes, E. (2010) 'Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge', *Clinical Microbiology and Infection*, pp. 225–231.
134. Jin, D., Luo, Y., Zhang, Z., Fang, W., Ye, J., Wu, F. and Ding, G. (2012) 'Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis', *FEMS Microbiology Letters*, pp. 72–80.
135. Joosse, J. and Van Elk, R. (1986) '*Trichobilharzia ocellata*: Physiological characterization of giant growth, glycogen depletion, and absence of reproductive activity in the intermediate snail host, *Lymnaea stagnalis*', *Experimental Parasitology*, 62(1), pp. 1–13.
136. Joslin, J. (2009) 'Blood Collection Techniques in Exotic Small Mammals', *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18(2), pp. 117–139.
137. Jouet, D., Ferté, H., Depaquit, J., Rudolfová, J., Latour, P., Zanella, D., Kaltenbach, M. L. and Léger, N. (2008) '*Trichobilharzia* spp. in natural conditions in Annecy Lake, France', *Parasitology Research*, 103(1), pp. 51–58.
138. Jouet, D., Skírnisson, K., Kolářová, L. and Ferté, H. (2010a) 'Final hosts and variability of *Trichobilharzia regenti* under natural conditions', *Parasitology Research*, 107(4), pp. 923–930.
139. Jouet, D., Skírnisson, K., Kolářová, L. and Ferté, H. (2010b) 'Molecular diversity of *Trichobilharzia franki* in two intermediate hosts (*Radix auricularia* and *Radix peregra*): A complex of species', *Infection, Genetics and Evolution*, 10(8), pp. 1218–1227.
140. Jung, K., Fleischhacker, M. and Rabien, A. (2010) 'Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-A critical appraisal of the literature', *Clinica Chimica Acta*, pp. 1611–1624.

141. **Kaewkong, W., Intapan, P. M., Sanpool, O., Janwan, P., Thanchomnang, T., Laummaunwai, P., Lulitanond, V., Doanh, P. N. and Maleewong, W. (2013)** 'Molecular Differentiation of *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* Eggs by Multiplex Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis', *The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), pp. 689–694.
142. **Karamon, J., Larska, M., Jasik, A. and Sell, B. (2015)** 'First report of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in farmed fallow deer (*Dama dama*) in Poland-Pathomorphological changes and molecular identification', *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(3), pp. 339–344.
143. **Kato-Hayashi, N., Kirinoki, M., Iwamura, Y., Kanazawa, T., Kitikoon, V., Matsuda, H. and Chigusa, Y. (2010)** 'Identification and differentiation of human schistosomes by polymerase chain reaction', *Experimental Parasitology*, 124(3), pp. 325–329.
144. **Kato-Hayashi, N., Yasuda, M., Yuasa, J., Isaka, S., Haruki, K., Ohmae, H., Osada, Y., Kanazawa, T. and Chigusa, Y. (2013)** 'Use of cell-free circulating schistosome DNA in serum, urine, semen, and saliva to monitor a case of refractory imported schistosomiasis hematobia', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), pp. 3435–3438.
145. **Kato-Hayashi, N., Leonardo, L. R., Arevalo, N. L., Tagum, M. N. B., Apin, J., Agsolid, L. M., Chua, J. C., Villacorte, E. A., Kirinoki, M., Kikuchi, M., Ohmae, H., Haruki, K. and Chigusa, Y. (2015)** 'Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines', *Acta Tropica*, 141(Part B), pp. 178–183.
146. **Kaukas, A., Dias Neto, E., Simpson, A. J., Southgate, V. R. and Rollinson, D. (1994)** 'A phylogenetic analysis of *Schistosoma haematobium* group species based on randomly amplified polymorphic DNA.', *International journal for parasitology*, 24(2), pp. 285–290.
147. **Keiser, J. and Utzinger, J. (2009)** 'Food-borne trematodiasis', *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 466–483.
148. **Khalife, J., Dunne, D. W., Richardson, B. a, Mazza, G., Thorne, K. J., Capron, a and Butterworth, a E. (1989)** 'Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*', *Journal of immunology*, 142(12), pp. 4422–4427.
149. **Kim, E.-M., Verweij, J. J., Jalili, a, van Lieshout, L., Choi, M.-H., Bae, Y. M., Lim, M. K. and Hong, S.-T. (2009)** 'Detection of *Clonorchis sinensis* in stool samples using real-time PCR.', *Annals of tropical medicine and parasitology*, 103(6), pp. 513–518.
150. **Kjetland, E. F., Ten Hove, R. J., Gomo, E., Midzi, N., Gwanzura, L., Mason, P., Friis, H., Verweij, J. J., Gundersen, S. G., Ndhlovu, P. D., Mduluzi, T. and Van Lieshout, L. (2009)** 'Schistosomiasis PCR in vaginal lavage as an indicator of genital *Schistosoma haematobium* infection in rural Zimbabwean women', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(6), pp. 1050–1055.
151. **van der Knaap, W. P. W. and Loker, E. S. (1990)** 'Immune mechanisms in trematode-snail interactions', *Parasitology Today*, pp. 175–182. doi: 10.1016/0169-4758(90)90349-9.
152. **Kock, S. (2001)** 'Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae)', *Parasitology*, 123(1), pp. 67–70.
153. **Kolářová, L., Horák, P., Skírnisson, K., Marečková, H. and Doenhoff, M. (2013)** 'Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease', *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(1), pp. 63–74.
154. **Kongklieng, A., Kaewkong, W., Intapan, P. M., Sanpool, O., Janwan, P., Thanchomnang, T., Lulitanond, V., Sri-Aroon, P., Limpanont, Y. and Maleewong, W. (2013)** 'Molecular Differentiation of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mekongi* by Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis', *The Korean Journal of Parasitology*, 51(6), pp. 651–656.
155. **Kouřilová, P. and Kolářová, L. (2002)** 'Variations in immunofluorescent antibody response against *Trichobilharzia* and *Schistosoma* antigens in compatible and incompatible hosts', *Parasitology Research*, 88(6), pp. 513–521.
156. **Kouřilová, P., Syrůček, M. and Kolářová, L. (2004a)** 'The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status', *Parasitology Research*, 93(1), pp. 8–16.
157. **Kouřilová, P., Hogg, K. G., Kolarova, L. and Mountford, A. P. (2004b)** 'Cercarial Dermatitis Caused by Bird Schistosomes Comprises Both Immediate and Late Phase Cutaneous Hypersensitivity Reactions', *The Journal of Immunology*, 172(6), pp. 3766–3774.

158. Králová-Hromadová, I., Špakulová, M., Horáčková, E., Turčeková, L., Novobilský, A., Beck, R., Koudela, B., Marinculić, A., Rajský, D. and Pybus, M. (2008) 'Sequence Analysis of Ribosomal and Mitochondrial Genes of the Giant Liver Fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): Intraspecific Variation and Differentiation from *Fasciola hepatica*', *Journal of Parasitology*, 94(1), pp. 58–67.
159. Kumagai, T., Furushima-Shimogawara, R., Ohmae, H., Wang, T. P., Lu, S., Chen, R., Wen, L. and Ohta, N. (2010) 'Detection of early and single infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(3), pp. 542–548.
160. Kumar, N. S. and Gurusubramanian, G. (2011) 'Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications', *Sci Vis*, 11(3), pp. 116–124.
161. Laha, T., Brindley, P. J., Smout, M. J., Verity, C. K., McManus, D. P. and Loukas, A. (2002) 'Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*', *International Journal for Parasitology*, 32(9), pp. 1163–1174.
162. Larionov, A., Krause, A. and Miller, W. (2005) 'A standard curve based method for relative real time PCR data processing', *BMC Bioinformatics*, 6, p. 62.
163. Lawton, S. P., Hirai, H., Ironside, J. E., Johnston, D. A. and Rollinson, D. (2011) 'Genomes and geography: Genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*', *Parasites and Vectors*.
164. Le, T. H., Blair, D. and McManus, D. P. (2000a) 'Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny', *Acta Tropica*, pp. 243–256.
165. Le, T. H., Blair, D., Agatsuma, T., Humair, P. F., Campbell, N. J., Iwagami, M., Littlewood, D. T., Peacock, B., Johnston, D. a, Bartley, J., Rollinson, D., Herniou, E. a, Zarlenga, D. S. and McManus, D. P. (2000b) 'Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders-a cautionary tale from the parasitic flatworms.', *Molecular biology and evolution*, 17(7), pp. 1123–1125.
166. Le, T. H., Blair, D. and McManus, D. P. (2002) 'Mitochondrial genomes of parasitic flatworms', *Trends in Parasitology*, pp. 206–213.
167. Le, T. H., Van De, N., Blair, D., Sithithaworn, P. and McManus, D. P. (2006) '*Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: Development of a mitochondrial-based multiplex PCR for their identification and discrimination', *Experimental Parasitology*, 112(2), pp. 109–114.
168. Lefever, S., Hellemans, J., Pattyn, F., Przybylski, D. R., Taylor, C., Geurts, R., Untergasser, A. and Vandesompele, J. (2009) 'RDML: Structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data', *Nucleic Acids Research*, 37(7), pp. 2065–2069.
169. Lever, J. and Bekius, R. (1965) 'On the presence of an external hemal pore in *Lymnaea stagnalis* L.', *Experientia*, 21(7), pp. 395–396.
170. Li, J., Zhao, G. H., Lin, R. Q., Blair, D., Sugiyama, H. and Zhu, X. Q. (2015) 'Rapid detection and identification of four major *Schistosoma* species by high-resolution melt (HRM) analysis', *Parasitology Research*, 114(11), pp. 4225–4232.
171. Lier, T., Simonsen, G. S., Wang, T., Lu, D., Haukland, H. H., Vennervald, B. J., Hegstad, J. and Johansen, M. V (2009) 'Real-time polymerase chain reaction for detection of low-intensity *Schistosoma japonicum* infections in China', *Am J Trop Med Hyg*, 81(3), pp. 428–432.
172. Lichtenbergová, L., Kolbeková, P., Kouřilová, P., Kašný, M., Mikeš, L., Haas, H., Schramm, G., Horák, P., Kolářová, L. and Mountford, A. P. (2008) 'Antibody responses induced by *Trichobilharzia regenti* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis', *Parasite Immunology*, 30(11–12), pp. 585–595.
173. Lichtenbergová, L., Lassmann, H., Jones, M. K., Kolářová, L. and Horák, P. (2011) '*Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice', *Experimental Parasitology*, 128(4), pp. 328–335.
174. Lin, M. H., Chen, T. C., Kuo, T. T., Tseng, C. C. and Tseng, C. P. (2000) 'Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*.', *Journal of clinical microbiology*, 38(11), pp. 4121–5.
175. Littlewood, D. T. J., Lockyer, A. E., Webster, B. L., Johnston, D. A. and Le, T. H. (2006) 'The complete mitochondrial genomes of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma spindale* and the evolutionary history of mitochondrial genome changes among parasitic flatworms', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(2), pp. 452–467.
176. Lo, Y. M., Hjelm, N. M., Fidler, C., Sargent, I. L., Murphy, M. F., Chamberlain, P. F., Poon, P. M., Redman, C. W. and Wainscoat, J. S. (1998) 'Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.', *The New England journal of medicine*, 339(24), pp. 1734–8.

177. Lo, Y. M. D., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M. Z. and Hjelm, N. M. (1999) 'Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma', *The American Journal of Human Genetics*, 64(1), pp. 218–224.
178. Lo, Y. M. D. and Chiu, R. W. K. (2008) 'Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis', *Clinical Chemistry*, 54(3), pp. 461–466.
179. Lockyer, A. E., Olson, P. D., Østergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D. A., Attwood, S. W., Southgate, V. R., Horak, P., Snyder, S. D., Le, T. H., Agatsuma, T., McManus, D. P., Carmichael, A. C., Naem, S. and Littlewood, D. T. J. (2003) 'The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858', *Parasitology*, 126(3), pp. 203–224.
180. Lodes, M. J. and Yoshino, T. P. (1990) 'The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility', *Journal of Invertebrate Pathology*, 56(1), pp. 75–85.
181. Lodh, N., Mwansa, J. C. L., Mutengo, M. M. and Shiff, C. J. (2013) 'Diagnosis of *Schistosoma mansoni* without the stool: comparison of three diagnostic tests to detect *Schistosoma mansoni* infection from filtered urine in Zambia.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 89(1), pp. 46–50.
182. Lodh, N., Naples, J. M., Bosompem, K. M., Quartey, J. and Shiff, C. J. (2014) 'Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* from endemic areas in Ghana', *PLoS ONE*, 9(3).
183. Loker, E. S. and Adema, C. M. (1995) 'Schistosomes, Echinostomes and Snails: Comparative Immunobiology', *Parasitology Today*, 11(3), pp. 120–124.
184. Loker, E. S. and Brant, S. V. (2006) 'Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes', *Trends in Parasitology*, pp. 521–528.
185. López-Flores, I. and Garrido-Ramos, M. A. (2012) 'The repetitive DNA content of eukaryotic genomes', *Genome Dynamics*, 7, pp. 1–28.
186. Lovis, L., Mak, T. K., Phongluxa, K., Soukhathammavong, P., Sayasone, S., Akkhavong, K., Odermatt, P., Keiser, J. and Felger, I. (2009) 'PCR diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), pp. 1517–1523.
187. Magalhães, K. G., Jannotti Passos, L. K. and Dos Santos Carvalho, O. (2004) 'Detection of *Lymnaea columella* infection by *Fasciola hepatica* through multiplex-PCR', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(4), pp. 421–424.
188. Macháček, T., Turjanicová, L., Bulantová, J., Hrdý, J., Horák, P. and Mikeš, L. (in preparation) Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of symptoms and immune response in ten human cases
189. Mandel, P. and Metais, P. (1948) 'Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme', *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 142(3–4), pp. 241–3.
190. Marcilla, A., Bargues, M. D. and Mas-Coma, S. (2002) 'A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*', *Molecular and Cellular Probes*, 16(5), pp. 327–333.
191. Marshall, O. J. (2004) 'PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR', *Bioinformatics*, 20(15), pp. 2471–2472.
192. Marti, H. and Hatz, C. (2017) 'Eosinophilie und Parasiten', *Therapeutische Umschau. Hogrefe AG*, 74(6), pp. 297–300.
193. Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F. A. and Martínez-Valladares, M. (2012) 'Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep', *Veterinary Parasitology*, 190(1–2), pp. 80–86.
194. Matheson, C. D., David, R., Spigelman, M. and Donoghue, H. D. (2014) 'Molecular Confirmation of *Schistosoma* and Family Relationship in two Ancient Egyptian Mummies', *Yearbook of Mummy Studies*, 2(March), pp. 39–47.
195. McGarry, J. W., Ortiz, P. L., Hodgkinson, J. E., Goreish, I. and Williams, D. J. L. (2007) 'PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(5), pp. 415–421.
196. McLaren, D. J. and Hockley, D. J. (1977) 'Blood flukes have a double outer membrane', *Nature*, 269(5624), pp. 147–149.
197. Méabed, E. M. H., Taher, E. E., Kamel, N. O., El-Bahy, M. M. and Shabrawi Taher, E. El (2016) 'Sandwich ELISA & Conventional PCR for Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection (A Field Study)', *Egyptian Journal of Environmental Research EJER*, 5(5).

198. Melzak, K. A., Sherwood, C. S., Turner, R. F. B. and Haynes, C. A. (1996) 'Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions', *Journal of Colloid and Interface Science*, 181(2), pp. 635–644.
199. Meurs, L., Brien, E., Mbow, M., Ochola, E. A., Mboup, S., Karanj, D. M. S., Secor, E. E., Polman, K. and van Lieshout, L. (2015) 'Is PCR the next reference standard for the diagnosis of schistosoma in stool? A comparison with microscopy in Senegal and Kenya', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), pp. 1–16.
200. Mikeš, L., Zidková, L., Kašný, M., Dvořák, J. and Horák, P. (2005) 'In vitro stimulation of penetration gland emptying by *Trichobilharzia szidati* and *T. regenti* (Schistosomatidae) cercariae. Quantitative collection and partial characterization of the products', *Parasitology Research*, 96(4), pp. 230–241.
201. Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L. and Ghiorse, W. C. (1999) 'Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), pp. 4715–4724.
202. Monis, P. T. and Andrews, R. H. (1998) 'Molecular epidemiology: Assumptions and limitations of commonly applied methods', in *International Journal for Parasitology*, pp. 981–987.
203. Montoya, A., Miró, G., Blanco, M. A. and Fuentes, I. (2010) 'Comparison of nested PCR and real-time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats', *Research in Veterinary Science*, 89(2), pp. 212–213.
204. Mori, Y. and Notomi, T. (2009) 'Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases', *Journal of Infection and Chemotherapy*, pp. 62–69.
205. Morozova, E. V., Ryskov, A. P. and Semyenova, S. K. (2002) 'RAPD Variation in Two Trematode Species (*Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*) from a Single Cattle Population', *Russian Journal of Genetics*, 38(8), pp. 977–983.
206. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction', *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), pp. 263–273.
207. Mullis, K. B. (1990) 'The unusual origin of the polymerase chain reaction', *Scientific American*, 262(4), pp. 56–65.
208. Nagamine, K., Hase, T. and Notomi, T. (2002) 'Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers', *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), pp. 223–229.
209. Neuhaus, W. (1952) 'Biologie und Entwicklung von *Trichobilharzia szidati* n. sp. (Trematoda, Schistosomatidae), einem Erreger von Dermatitis beim Menschen', *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 15(3), pp. 203–266.
210. Ngotho, M., Kagira, J. M., Gachie, B. M., Karanja, S. M., Waema, M. W., Maranga, D. N., Maina, N. W., Ngotho, M., Kagira, J. M., Gachie, B. M., Karanja, S. M., Waema, M. W., Maranga, D. N. and Maina, N. W. (2015) 'Loop Mediated Isothermal Amplification for Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in Urine and Saliva Samples in Nonhuman Primate Model', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–7.
211. Nick, D. (2014) *Interpreting Melt Curves : An Indicator, Not a Diagnosis, Integrated DNA Technologies, Inc.*
212. Nishiguchi, M. K., Doukakis, P., Egan, M., Kizirian, D., Phillips, a, Prendini, L., Rosenbaum, H. C., Torres, E., Wyner, Y., DeSalle, R. and Giribet, G. O. N. Z. a. L. O. (2002) 'DNA Isolation Procedures', *Techniques in Molecular Systematics and Evolution*, pp. 249–287.
213. Nolan, M. J. and Cribb, T. H. (2005) 'The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species', *Advances in Parasitology*, pp. 101–163.
214. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', *Nucleic Acids Research*, 28(12), p. E63.
215. Obeng, B. B., Aryeetey, Y. A., de Dood, C. J., Amoah, A. S., Larbi, I. A., Deelder, A. M., Yazdanbakhsh, M., Hartgers, F. C., Boakye, D. A., Verweij, J. J., van Dam, G. J. and van Lieshout, L. (2008) 'Application of a circulating-cathodic-antigen (CCA) strip test and real-time PCR, in comparison with microscopy, for the detection of *Schistosoma haematobium* in urine samples from Ghana', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 102(7), pp. 625–633.
216. Oliveira, L. M. A., Santos, H. L. C., Gonçalves, M. M. L., Barreto, M. G. M. and Peralta, J. M. (2010) 'Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity *Schistosoma mansoni* infection', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 68(4), pp. 416–421.

217. **Olivier, L. and Mao, C. P. (1949)** 'The early larval stages of schistosoma mansoni Sambon, 1907 in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1818)'.
218. **Ottesen, E. A., Weller, P. F. and Heck, L. (1977)** 'Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis', *Immunology*, 33(3), pp. 413–421.
219. **Owczarzy, R., Tataurov, A. V., Wu, Y., Manthey, J. A., McQuisten, K. A., Almabrazi, H. G., Pedersen, K. F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N. O., Sailor, C. A., Dawson, R. B. and Peek, A. S. (2008)** 'IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers.', *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue).
220. **Paci, M., Maramotti, S., Bellesia, E., Formisano, D., Albertazzi, L., Ricchetti, T., Ferrari, G., Annessi, V., Lasagni, D., Carbonelli, C., De Franco, S., Brini, M., Sgarbi, G. and Lodi, R. (2009)** 'Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer.', *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 64(1), pp. 92–7.
221. **Palinauskas, V., Križanauskiene, A., Iezhova, T. A., Bolshakov, C. V., Jönsson, J., Bensch, S. and Valkiunas, G. (2013)** 'A new method for isolation of purified genomic DNA from haemosporidian parasites inhabiting nucleated red blood cells', *Experimental Parasitology*, 133(3), pp. 275–280.
222. **Parvathi, A., Sanath Kumar, H., Kenchanna Prakasha, B., Lu, J., Xu, X., Hu, W., Feng, Z., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. (2007)** 'Clonorchis sinensis: Development and evaluation of a nested polymerase chain reaction (PCR) assay', *Experimental Parasitology*, 115(3), pp. 291–295.
223. **Pearce, E. J., Vasconcelos, J. P., Brunet, L. R. and Sabin, E. A. (1996)** 'IL-4 in schistosomiasis', *Experimental Parasitology*, pp. 295–299.
224. **Peruski, A. H. and Peruski, L. F. J. (2003)** 'Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents', *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4), pp. 506–513.
225. **Pešťová, J. (2015)** 'Diferenciace totipotentních zárodečných buněk u larev ptačích schistosom', *Diplomová práce*
226. **Pfaffl, M. W. (2001)** 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), p. 45e–45.
227. **Picard, D. and Jousson, O. (2001)** 'Genetic variability among cercariae of the Schistosomatidae (Trematoda: Digenea) causing swimmer's itch in Europe.', *Parasite (Paris, France)*, 8(3), pp. 237–242.
228. **Pillay, P., Taylor, M., Zulu, S., Gundersen, S. G., Kleppa, E., Lillebo, K., Kjetland, E. F., Brien, E. and van Lieshout, L. (2014)** 'Schistosoma PCR among high school girls in South Africa as a complimentary diagnostic tool for Female Genital Schistosomiasis (FGS)', *International Journal of Infectious Diseases*, 21, p. 171.
229. **Pillay, P., van Lieshout, L., Taylor, M., Sebitloane, M., Zulu, S. G., Kleppa, E., Roald, B. and Kjetland, E. F. (2016)** 'Cervical cytology as a diagnostic tool for female genital schistosomiasis: Correlation to cervical atypia and Schistosoma polymerase chain reaction.', *CytoJournal*, 13(1), p. 10.
230. **Pontes, L. A., Dias-Neto, E. and Rabello, A. (2002)** 'Detection by polymerase chain reaction of Schistosoma mansoni DNA in human serum and feces.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(2), pp. 157–162.
231. **Pontes, L. A., Oliveira, M. C., Katz, N., Dias-Neto, E. and Rabello, A. (2003)** 'Comparison of a polymerase chain reaction and the Kato-Katz technique for diagnosing infection with Schistosoma mansoni', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(6), pp. 652–656.
232. **Quispe-Tintaya, W., White, R. R., Popov, V. N., Vijg, J. and Maslov, A. Y. (2013)** 'Fast mitochondrial DNA isolation from mammalian cells for next-generation sequencing', *BioTechniques*, 55(3), pp. 133–136.
233. **Radvánský, J., Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Minárik, G. and Kádaši, L. (2011)** 'Development of high-resolution melting (HRM) analysis for population studies of Fascioloides magna (Trematoda: Fasciolidae), the giant liver fluke of ruminants', *Parasitology Research*, 108(1), pp. 201–209.
234. **Rahman, S. M. M., Song, H. B., Jin, Y., Oh, J. K., Lim, M. K., Hong, S. T. and Choi, M. H. (2017)** 'Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting cox1 gene for the detection of Clonorchis sinensis in human fecal samples', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10).
235. **Rai, S. L. and Clegg, J. A. (1968)** 'Death of schistosome cercariae during penetration of the skin: I. Penetration of bird skin by Austroilharzia terrigalensis', *Parasitology*, 58(1), pp. 199–214.

236. **Ramadan, N. I. and Saber, L. M. (2004)** 'Detection of genetic variability in nonhuman isolates of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by the RAPD-PCR technique.', *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 34(2), pp. 679–689.
237. **Reed, G. H., Kent, J. O. and Wittwer, C. T. (2007)** 'High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics', *Pharmacogenomics*, 8(6), pp. 597–608.
238. **Reslová, N., Michna, V., Kasny, M., Mikel, P. and Kralik, P. (2017a)** 'xMAP technology: Applications in detection of pathogens', *Frontiers in Microbiology*.
239. **Reslová, N., Škorpíková, L., Slaný, M., Pozio, E. and Kašný, M. (2017b)** 'Fast and Reliable Differentiation of Eight *Trichinella* Species Using a High Resolution Melting Assay', *Scientific Reports*, 7(1).
240. **Rinaldi, L., Coles, G. C., Aurelli, M. P., Musella, V. and Cringoli, G. (2011)** 'Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep', *Veterinary Parasitology*, 177(3–4), pp. 345–352.
241. **Rubio, J. M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P. J., García, M. L., Micó, M., Edú, M. and Alvar, J. (1999)** 'Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea.', *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60(2), pp. 183–7.
242. **Rudolfová, J., Hampl, V., Bayssade-Dufour, C., Lockyer, A. E., Littlewood, D. T. J. and Horák, P. (2005)** 'Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host', *Parasitology Research*, 95(2), pp. 79–89.
243. **Rudolfová, J., Sitko, J. and Horák, P. (2006)** 'Unusual finding of *Trichobilharzia* sp. in *Motacilla alba* in the Czech Republic.', *Journal of helminthology*, 80, pp. 83–85.
244. **Russomando, G., Figueredo, A., Almiron, M., Sakamoto, M. and Morita, K. (1992)** 'Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum', *Journal of Clinical Microbiology*, 30(11), pp. 2864–2868.
245. **Sady, H., Al-Mekhlafi, H., Ngui, R., Atroosh, W., Al-Delaimy, A., Nasr, N., Dawaki, S., Abdulsalam, A., Ithoi, I., Lim, Y., Chua, K. and Surin, J. (2015)** 'Detection of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* by Real-Time PCR with High Resolution Melting Analysis', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), pp. 16085–16103.
246. **Sager, H., Moret, C. S., Grimm, F., Deplazes, P., Doherr, M. G. and Gottstein, B. (2006)** 'Coprological study on intestinal helminths in Swiss dogs: Temporal aspects of anthelmintic treatment', *Parasitology Research*, 98(4), pp. 333–338.
247. **Saiki, R. ., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B. and Horn, G. T. (1985)** 'Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, 239, pp. 1350–54.
248. **Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. and Erlich, H. (1988)** 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239(4839), pp. 487–491.
249. **Saiyed, Z. M., Bochiwal, C., Gorasia, H., Telang, S. D. and Ramchand, C. N. (2006)** 'Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells', *Analytical Biochemistry*, 356(2), pp. 306–308.
250. **Sambrook, J. and W Russell, D. (2001)** 'Molecular Cloning: A Laboratory Manual', *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, p. 999.
251. **Sandoval, N., Siles-Lucas, M., Pérez-Arellano, J. L., Carranza, C., Puente, S., López-Abán, J. and Muro, A. (2006)** 'A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples', *Parasitology*, 133(5), pp. 581–587.
252. **Sapp, K. K. and Loker, E. S. (2000)** 'A comparative study of mechanisms underlying digenean-snail specificity: in vitro interactions between hemocytes and digenean larvae.', *The Journal of parasitology*, 86(5), pp. 1020–9.
253. **Semyenova, S. K., Khrisanfova, G. G., Filippova, E. K., Beér, S. a, Voronin, M. V and Ryskov, P. (2005)** 'Individual and population variation in cercariae of bird schistosomes of the *Trichobilharzia ocellata* species group as revealed with the polymerase chain reaction', *Genetika*, 41(1), pp. 17–22.
254. **Semyenova, S. K., Morozova, E. V, Khrisanfova, G. G., Gorokhov, V. V, Arkhipov, I. a, Moskvín, A. S., Movsessyan, S. O. and Ryskov, A. P. (2006)** 'Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes.', *The Journal of parasitology*, 92(3), pp. 525–530.

255. Semyenova, S., Chrisanfova, G., Mozharovskaya, L., Guliaev, A. and Ryskov, A. (2017) 'The complete mitochondrial genome of the causative agent of the human cercarial dermatitis, the visceral bird schistosome species *Trichobilharzia szidati* (platyhelminthes: Trematoda: Schistosomatidae)', *Mitochondrial DNA Part B*. Taylor & Francis, 2(2), pp. 469–470.
256. Shiff, C. (2015) 'Accurate diagnostics for schistosomiasis: a new role for PCR?', *Reports in Parasitology*, 4, pp. 23–29.
257. Schets, F. M., Lodder, W. J. and De Roda Husman, A. M. (2010) 'Confirmation of the presence of *Trichobilharzia* by examination of water samples and snails following reports of cases of cercarial dermatitis', *Parasitology*, 137(1), pp. 77–83.
258. Schunk, M., Mekonnen, S. K., Wondafrash, B., Mengele, C., Fleischmann, E., Herbringer, K. H., Verweij, J. J., Geldmacher, C., Bretzel, G., Löscher, T. and Zeynudin, A. (2015) 'Use of occult blood detection cards for real-Time PCR-Based diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection', *PLoS ONE*, 10(9).
259. Schweizer, G., Meli, M. L., Torgerson, P. R., Lutz, H., Deplazes, P. and Braun, U. (2007) 'Prevalence of *Fasciola hepatica* in the intermediate host *Lymnaea truncatula* detected by real time TaqMan PCR in populations from 70 Swiss farms with cattle husbandry', *Veterinary Parasitology*, 150(1–2), pp. 164–169.
260. da Silva, M. A. L., Medeiros, Z., Soares, C. R. P., da Silva, E. D., Miranda-Filho, D. B. and de Melo, F. L. (2014) 'A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), pp. 193–197.
261. Sire, C., Durand, P., Pointier, J. P. and Théron, A. (2001a) 'Genetic diversity of *Schistosoma mansoni* within and among individual hosts (*Rattus rattus*): Intrapopulation differentiation at microspatial scale', *International Journal for Parasitology*, 31(14), pp. 1609–1616.
262. Sire, C., Langand, J., Barral, V. and Théron, A. (2001b) 'Parasite (*Schistosoma mansoni*) and host (*Biomphalaria glabrata*) genetic diversity: Population structure in a fragmented landscape', *Parasitology*, 122(5), pp. 545–554.
263. Sluiter, J. F., Brussaard-Wüst, C. M. and Meuleman, E. A. (1980) 'The relationship between miracidial dose, production of cercariae, and reproductive activity of the host in the combination *Trichobilharzia ocellata* and *Lymnaea stagnalis*', *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research*, 63(1), pp. 13–26.
264. Sluiter, J. F. (1981) 'Development of *Trichobilharzia ocellata* in *Lymnaea stagnalis* and the effects of infection on the reproductive system of the host', *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research*, 64(3), pp. 303–319.
265. Sorber, L., Zwaenepoel, K., Deschoolmeester, V., Roeyen, G., Lardon, F., Rolfo, C. and Pauwels, P. (2017) 'A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma', *Journal of Molecular Diagnostics*, 19(1), pp. 162–168.
266. Sørensen, E., Bøgh, H. O., Johansen, M. V. and McManus, D. P. (1999) 'PCR-based identification of individuals of *Schistosoma japonicum* representing different subpopulations using a genetic marker in mitochondrial DNA', *International Journal for Parasitology*, 29(7), pp. 1121–1128.
267. Sozzi, G., Conte, D., Leon, M. E., Cirincione, R., Roz, L., Ratcliffe, C., Roz, E., Cirenei, N., Bellomi, M., Pelosi, G., Pierotti, M. A. and Pastorino, U. (2003) 'Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 21(21), pp. 3902–3908.
268. Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. and Anker, P. (2001) 'About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release', in *Clinica Chimica Acta*, pp. 139–142.
269. Sue, M. J., Yeap, S. K., Omar, A. R. and Tan, S. W. (2014) 'Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis', *BioMed Research International*.
270. Sugiyama, H., Morishima, Y., Kameoka, Y. and Kawanaka, M. (2002) 'Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular discrimination between *Paragonimus westermani* and *P. miyazakii* at the metacercarial stage', *Molecular and Cellular Probes*. Academic Press, 16(3), pp. 231–236.
271. Suksumek, N., Leelawat, K., Leelawat, S., Russell, B. and Lek-Uthai, U. (2008) 'TaqMan real-time PCR assay for specific detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in Thai patients with hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma', *Experimental Parasitology*, 119(2), pp. 217–224.
272. Suzuki, N., Kamataki, A., Yamaki, J. and Homma, Y. (2008) 'Characterization of circulating DNA in healthy human plasma', *Clinica Chimica Acta*, 387(1–2), pp. 55–58.

273. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R. and Růžicková, V. (2008) 'Metody molekulární biologie', Masarykova univerzita, Brno. 188 pp.
274. Tan, S. C. and Yip, B. C. (2009) 'DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
275. Taniuchi, M., Verweij, J. J., Noor, Z., Sobuz, S. U., Van Lieshout, L., Petri, W. A., Haque, R. and Houpt, E. R. (2011) 'High throughput multiplex PCR and probe-based detection with luminex beads for seven intestinal parasites', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(2), pp. 332–337.
276. Tavares, R., Staggemeier, R., Borges, A., Rodrigues, M., Castelan, L., Vasconcelos, J., Anschau, M. and Spalding, S. (2011) 'Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection', *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17(3), pp. 239–248.
277. Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. and Nguyen, M. (2010) 'A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines', *Methods*.
278. Tian, H., Hühmer, A. F. R. and Landers, J. P. (2000) 'Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of dna from complex biological matrices in a miniaturized format', *Analytical Biochemistry*, 283(2), pp. 175–191.
279. Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G. and Pfaffl, M. W. (2003) 'Erratum: Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up (Nucleic Acids Research (2003) vol. 31 (e122))', *Nucleic Acids Research*, p. 6688.
280. Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. and Notomi, T. (2008) 'Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products', *Nature Protocols*, 3(5), pp. 877–882.
281. Tong, Y. K. and Lo, Y. M. D. (2006) 'Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids', *Clinica Chimica Acta*, pp. 187–196.
282. Tong, Q., Lu, S., Wang, T., Chen, R., Lou, D., & Zhuo, M. (2009) 'Detection of *Schistosoma japonicum* infection by nested-PCR', *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 16(4), 203–207.
283. Tong, Q. B., Chen, R., Zhang, Y., Yang, G. J., Kumagai, T., Furushima-Shimogawara, R., Lou, D., Yang, K., Wen, L. Y., Lu, S. H., Ohta, N. and Zhou, X. N. (2015) 'A new surveillance and response tool: Risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from pooled samples', *Acta Tropica*, 141(Part B), pp. 170–177.
284. Traversa, D., Fichi, G., Campigli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C. J., Pellegrini, D. and Perrucci, S. (2008) 'A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea)', *Veterinary Parasitology*, 152(3–4), pp. 271–277.
285. Tsiatis, A. C., Norris-Kirby, A., Rich, R. G., Hafez, M. J., Gocke, C. D., Eshleman, J. R. and Murphy, K. M. (2010) 'Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications.', *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 12(4), pp. 425–32.
286. Turjanicová, L., Mikeš, L., Pecková, M. and Horák, P. (2015) 'Antibody response of definitive hosts against antigens of two life stages of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*', *Parasites and Vectors*, 8(1).
287. Ugarkovic, D. (2005) 'Functional elements residing within satellite DNAs', *EMBO Reports*, pp. 1035–1039.
288. Vaščíková, M., (2015) 'Molekulárna a sérologická diagnostika nákaz trichobilharziami', *Diplomová práce*
289. Velusamy, R., Singh, B. P. and Raina, O. K. (2004) 'Detection of *Fasciola gigantica* infection in snails by polymerase chain reaction', *Veterinary Parasitology*, 120(1–2), pp. 85–90.
290. Verweij, J. J., Pit, D. S. S., Van Lieshout, L., Baeta, S. M., Dery, G. D., Gasser, R. B. and Polderman, A. M. (2001) 'Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples', *Tropical Medicine and International Health*, 6(9), pp. 726–731.
291. Vilas, R., Criscione, C. D. and Blouin, M. S. (2005) 'A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites', *Parasitology*, 131(6), pp. 839–846.
292. Vinkes Melchers, N. V. S., van Dam, G. J., Shaproski, D., Kahama, A. I., Brien, E. A. T., Vennervald, B. J. and van Lieshout, L. (2014) 'Diagnostic Performance of *Schistosoma* Real-Time PCR in Urine Samples from Kenyan Children Infected with *Schistosoma haematobium*: Day-to-day Variation and Follow-up after Praziquantel Treatment', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4).

293. Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. (1991) 'Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR- Based Typing from Forensic Material', *BioTechniques*, 10, pp. 506–513.
294. Webster, B. L., Rollinson, D., Stothard, J. R. and Huyse, T. (2010) 'Rapid diagnostic multiplex PCR (RD-PCR) to discriminate *Schistosoma haematobium* and *S. bovis*', *Journal of Helminthology*, 84(1), pp. 107–114.
295. Webster, B. L., Rudolfová, J., Horák, P. and Littlewood, D. T. J. (2007) 'The complete mitochondrial genome of the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* (Platyhelminthes: Digenea), causative agent of cercarial dermatitis.', *The Journal of parasitology*, 93(3), pp. 553–561.
296. Weerakoon, K. G. A. D., Gobert, G. N., Cai, P. and McManus, D. P. (2015) 'Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis', *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), pp. 939–967.
297. Weerakoon, K. G. and McManus, D. P. (2016) 'Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections', *Trends in Parasitology*, 32(5), pp. 378–391. doi: 10.1016/j.pt.2016.01.006.
298. WHO (2018) 'Schistosomiasis' WHO. World Health Organization.
299. Weerakoon, K. G., Gordon, C. A., Gobert, G. N., Cai, P. and McManus, D. P. (2016) 'Optimisation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: A duplex approach with DNA binding dye chemistry', *Journal of Microbiological Methods*, 125, pp. 19–27.
300. Wichmann, D., Panning, M., Quack, T., Kramme, S., Burchard, G. D., Grevelding, C. and Drosten, C. (2009) 'Diagnosing schistosomiasis by detection of cell-free parasite DNA in human plasma', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(4).
301. Wichmann, D., Poppert, S., Von Thien, H., Clerinx, J., Dieckmann, S., Jensenius, M., Parola, P., Richter, J., Schunk, M., Stich, A., Zanger, P., Burchard, G. D. and Tannich, E. (2013) 'Prospective European-wide multicentre study on a blood based real-time PCR for the diagnosis of acute schistosomiasis', *BMC Infectious Diseases*, 13(1).
302. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990) 'DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers', *Nucleic Acids Research*, 18(22), pp. 6531–6535.
303. Williams, L. R. (2001) 'Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels', *Biotechnic and Histochemistry*, 76(3), pp. 127–132.
304. Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G. and Pryor, R. J. (2003) 'High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen', *Clinical Chemistry*, 49(6), pp. 853–860.
305. Won, E. J., Kim, S. H., Kee, S. J., Shin, J. H., Suh, S. P., Chai, J. Y., Ryang, D. W. and Shin, M. G. (2016) 'Multiplex Real-Time PCR assay targeting eight parasites customized to the Korean population: Potential use for detection in diarrheal stool samples from gastroenteritis patients', *PLoS ONE*, 11(11).
306. Wong, M. L. and Medrano, J. F. (2005) 'Real-time PCR for mRNA quantitation', *BioTechniques*, pp. 75–85.
307. Wongratanacheewin, S., Pumidonming, W., Sermswan, R. W. and Maleewong, W. (2001) 'Development of a PCR-based method for the detection of *Opisthorchis viverrini* in experimentally infected hamsters', *Parasitology*, 122(2), pp. 175–180.
308. Wongratanacheewin, S., Pumidonming, W., Sermswan, R. W., Pipitgool, V. and Maleewong, W. (2002) 'Detection of *Opisthorchis viverrini* in human stool specimens by PCR [3]', *Journal of Clinical Microbiology*, pp. 3879–3880.
309. Wongsawad, C., Phalee, A., Noikong, W., Chuboon, S. and Nithikathkul, C. (2012) 'Co-infection with *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchis taichui* detected by human fecal examination in Chomtong district, Chiang Mai Province, Thailand', *Parasitology International*, 61(1), pp. 56–59.
310. Ximenes, C., Brandão, E., Oliveira, P., Rocha, A., Rego, T., Medeiros, R., Aguiar-Santos, A., Ferraz, J., Reis, C., Araujo, P., Carvalho, L. and Melo, F. L. (2014) 'Detection of *Wuchereria bancrofti* DNA in paired serum and urine samples using polymerase chain reaction-based systems', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(8), pp. 978–983.
311. Xu, J., Rong, R., Zhang, H. Q., Shi, C. J., Zhu, X. Q. and Xia, C. M. (2010) 'Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP)', *International Journal for Parasitology*, 40(3), pp. 327–331.
312. Xu, J., Liu, A. P., Guo, J. J., Wang, B., Qiu, S. J., Sun, H., Guan, W., Zhu, X. Q., Xia, C. M. and Wu, Z. D. (2013) 'The sources and metabolic dynamics of *Schistosoma japonicum* DNA in serum of the host', *Parasitology Research*, 112(1), pp. 129–133.

313. **Xu, X., Zhang, Y., Lin, D., Zhang, J., Xu, J., Liu, Y. min, Hu, F., Qing, X., Xia, C. and Pan, W. (2014)** 'Serodiagnosis of *Schistosoma japonicum* infection: Genome-wide identification of a protein marker, and assessment of its diagnostic validity in a field study in China', *The Lancet Infectious Diseases*, 14(6), pp. 489–497.
314. **Xu, J., Duan, Z. L., Guan, Z. X., Wang, Y. Y., Lin, C., Zhang, T. T., Zhang, H. Q., Qian, X. and Xia, C. M. (2017)** 'Early detection of circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in sentinel mice models', *Experimental Parasitology*, 176, pp. 82–88.
315. **Yakhchali, M., Hosseinpanahi, A. and Malekzadeh-Viayeh, R. (2016)** 'Molecular evidence of *Trichobilharzia* species (Digenea: Schistosomatidae) in the snails of *Lymnaea auricularia* from Urmia suburb, North West Iran', *Iranian Journal of Parasitology*, 11(3), pp. 296–302.
316. **Yamasaki, H., Allan, J. C., Sato, M. O., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Qiu, D., Mamuti, W., Craig, P. S. and Ito, A. (2004)** 'DNA Differential Diagnosis of Taeniasis and Cysticercosis by Multiplex PCR', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), pp. 548–553.
317. **Yu, J. R., Chung, J. S., Huh, S., Lee, S. H. and Chai, J. Y. (1997a)** 'PCR-RFLP pattern of three kinds of *Metagonimus* in Korea.', *The Korean journal of parasitology*, 35(4), pp. 271–276.
318. **Yu, J. R., Chung, J. S. and Chai, J. Y. (1997b)** 'Different RAPD patterns between *Metagonimus yokogawai* and *Metagonimus* Miyata type.', *The Korean journal of parasitology*, 35(4), pp. 295–298.
319. **Yu, S. C. Y., Lee, S. W. Y., Jiang, P., Leung, T. Y., Chan, K. C. A., Chiu, R. W. K. and Lo, Y. M. D. (2013)** 'High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing', *Clinical Chemistry*, 59(8), pp. 1228–1237.
320. **Zhang, W., Li, J. and McManus, D. P. (2003)** 'Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease', *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 18–36.
321. **Zimmermann, B., El-Sheikhah, A., Nicolaides, K., Holzgreve, W. and Hahn, S. (2005)** 'Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma', *Clinical Chemistry*, 51(9), pp. 1598–1604.